

**Die Regulation der endothelialen Barriere durch
5' AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bei
systemischer Entzündung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin Silke Lindenmüller
geboren am 22.06.1986 in VS-Villingen

Gutachter

1. Prof. Dr. Regine Heller, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
2. Prof. Dr. Ina Bergheim, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
3. Prof. Dr. Michael Torzewski, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

Tag der öffentlichen Disputation: 28.06.2016

Zusammenfassung

Endothelzellen kleiden das Innere der Blutgefäße aus und haben unter anderem die Aufgabe eine Barriere zwischen dem Blut und dem die Blutgefäße umgebenden Gewebe aufrecht zu erhalten. Die endotheliale Barriere ist im gesunden Zustand semipermeabel und erlaubt den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, gelösten Stoffen und Ionen. Sie wird durch Zell-Zell-Verbindungen wie Adhäsionsverbindungen und *tight junctions* aufrechterhalten.

Endothelzellen sind hoch aktiv und spielen bei Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle. Durch Stimulierung mit proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Lipopolysaccharid (LPS) wird eine Reihe von endothelialen Veränderungen wie die Expression von Zytokinen, prokoagulant Proteinen oder Adhäsionsmolekülen induziert. Zudem kommt es zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität.

Eine Entzündungsreaktion ist unter normalen Umständen streng reguliert und damit zeitlich und räumlich begrenzt. Unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung ist diese Begrenzung nicht mehr gegeben. Es kommt zu einer generalisierten endothelialen und mikrovaskulären Dysfunktion, welche vor allem durch eine Störung der endothelialen Barrierefunktion gekennzeichnet ist. Diese kann zur Funktionsstörung von Organen führen und Schwere und Verlauf des Krankheitsbildes wesentlich beeinflussen. Eine systemische Entzündung ist ein Kennzeichen der Sepsis, eines klinischen Syndroms, das weltweit zu den häufigsten Todesursachen in den Intensivstationen gehört.

Die 5' AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist vor allem als Energiesensorenzym bekannt. In Endothelzellen hat sie vaskuloprotektive, antiinflammatorische, antiatherogene sowie proangiogene Funktionen. Eine Verminderung der AMPK-Aktivität begünstigt die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob AMPK im Rahmen einer systemischen Entzündung inflammatorische Antworten des Endothels limitieren und die Entwicklung einer endothelialen beziehungsweise mikrovaskulären Dysfunktion beeinflussen kann und ob AMPK die endotheliale Barrierefunktion reguliert.

Zur Klärung dieser Frage wurden in Wildtyp (WT)- und AMPK α 1-*knockout* (KO)-Mäusen die systemische Entzündungsreaktion und die vaskuläre Permeabilität im Rahmen einer Endotoxinämie nach Administration von Lipopolysaccharid (LPS) untersucht. Des Weiteren wurden inflammatorische Signalwege in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) untersucht, in welchen die AMPK durch AMPK-Aktivatoren wie 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) aktiviert oder die katalytische AMPK α 1-Untereinheit mittels siRNA herunterreguliert wurde.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass weibliche AMPK α 1-KO-Mäuse mit einer erhöhten systemischen Entzündung und damit einhergehend mit einer erhöhten Mortalität auf eine LPS-Injektion reagieren. Zudem war eine erhöhte vaskuläre Permeabilität in der Leber von männlichen und weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen nach LPS-Injektion zu beobachten. Diese ging einher mit einer erhöhten hepatozellulären Schädigung, die anhand der Erhöhung der Transaminasen und weiterer Zellschädigungsparameter im Plasma nachweisbar war. LPS führte sowohl in WT- als auch in AMPK α 1-KO-Mäusen zu einer Endothelschädigung in Lebersinusoiden, die durch Färbung des Endothelzellmarkers *cluster of differentiation 31* (CD31) detektiert wurde. Gleichzeitig kam es zu Störungen der *tight junctions* mit einer Verminderung des *tight junction*-Proteins Claudin-5. Der LPS-induzierte Verlust von Claudin-5 war in AMPK α 1-KO-Mäusen sowie in AMPK α 1-depletierten HUVEC höher als in den jeweiligen Kontrollmäusen oder -zellen. Eine Aktivierung der AMPK führte *in vitro* zu antiinflammatorischen Effekten, die anhand der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nach Stimulierung mit Zytokinen und LPS nachgewiesen wurde. Unter den gleichen Bedingungen wurde die Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch AICAR vermindert. Der barriestabilisierende Effekt der AMPK-Aktivierung wurde zudem in Mäusen nachgewiesen, welche nach einer AICAR-Injektion eine verminderte LPS-induzierte Permeabilitätserhöhung in der Leber aufwiesen.

Insgesamt lassen die Daten dieser Arbeit darauf schließen, dass AMPK α 1 in weiblichen Mäusen das Ausmaß einer systemischen Entzündung kontrolliert, in weiblichen und männlichen Mäusen die vaskuläre Barriere in der Leber stabilisiert und so vor einer hepatozellulären Schädigung schützt. Die Aktivierung der AMPK stellt eine therapeutische Strategie dar, die zur Verbesserung der endothelialen Dysfunktion unter der Bedingung einer systemischen Entzündung beitragen kann.

Summary

Endothelial cells form the inner lining of blood vessels. Their function – among others – is to maintain a barrier between blood and the surrounding tissue. In a healthy state, the endothelial barrier is semipermeable and allows the controlled exchange of fluids, solutes and ions. It is stabilized by cell-cell-contacts like adherence or tight junctions.

Endothelial cells are highly active and play a major role in inflammatory processes. Stimulation with pro-inflammatory mediators like interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) or lipopolysaccharide (LPS) leads to a set of endothelial changes like the expression of cytokines, procoagulant proteins or adhesion molecules. In addition, endothelial permeability is increased.

An inflammatory reaction is normally strictly regulated and therefore temporally and spatially limited. Under conditions of systemic inflammation these limitations disappear, which leads to a general endothelial and microvascular dysfunction characterized by a disruption of the endothelial barrier function. Barrier dysfunction leads to organ dysfunction and influences the severity and course of the disease. Systemic inflammation is a characteristic of sepsis, a clinical syndrome that is one of the most common causes of death in intensive care units worldwide.

The 5' AMP activated protein kinase (AMPK) is mainly known as an energy sensor enzyme. In endothelial cells, it has vasculoprotective, anti-inflammatory, anti-atherogenic and pro-angiogenic functions. Decreased AMPK-activity may contribute to the development of endothelial dysfunction. The aim of this thesis was to investigate whether AMPK can limit inflammatory responses of the endothelium under conditions of a systemic inflammation and modulate the development of microvascular dysfunction, and whether AMPK regulates the endothelial barrier.

To answer this question, systemic inflammatory responses and vascular permeability were investigated in wildtype (WT)- and AMPK α 1-knockout (KO)-mice after administration of lipopolysaccharide (LPS). In addition, inflammatory pathways were studied in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in which AMPK was activated by AMPK activators like 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) or in which the catalytic AMPK α 1-subunit was downregulated via siRNA.

The obtained data show that female AMPK α 1-KO-mice react with a higher systemic inflammatory response and with an increased mortality in response to LPS-injection. In addition, an increased LPS-induced vascular permeability in the liver of male and female AMPK α 1-KO-mice was observed, which was accompanied by enhanced hepatocellular

damage as detected by increased plasma transaminases. LPS-injection led to endothelial damage in liver sinusoids in WT- and AMPK α 1-KO-mice, which was shown by irregular staining of the endothelial marker cluster of differentiation 31 (CD31). In addition, tight junctions were disturbed as the tight junction protein claudin-5 was less expressed after LPS-injection. The LPS-induced loss of claudin-5 was slightly higher in AMPK α 1-KO-mice and in HUVEC with downregulated AMPK α 1 when compared to the respective controls. The pharmacological activation of AMPK in HUVEC elicits an anti-inflammatory effect by diminishing the cytokine-induced expression of adhesion molecules and stabilizing the endothelial barrier under inflammatory conditions. The barrier protective effect of AMPK activation was also shown in mice, which expressed a reduced LPS-induced increase in permeability after injection of AICAR.

In summary, the data of this thesis suggest that AMPK α 1 controls systemic inflammation in female mice and protects from vascular barrier dysfunction and cellular damage in the liver of male and female mice. An activation of AMPK represents a therapeutic strategy, which can prevent or ameliorate endothelial dysfunction under conditions of systemic inflammation.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | iv |
| Summary | vi |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Endothel | 1 |
| 1.2 Endothel und Entzündung | 2 |
| 1.3 Endothel und Barriere | 4 |
| 1.4 Systemische Entzündung und Sepsis | 6 |
| 1.5 Struktur, Aktivierung und Funktion der AMPK | 9 |
| 1.6 AMPK im Endothel..... | 12 |
| 1.7 AMPK und Entzündung | 14 |
| 1.8 Zielstellung..... | 15 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 2.1 Material..... | 16 |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien | 16 |
| 2.1.2 Inhibitoren und Stimulanzen | 18 |
| 2.1.3 Antikörper..... | 18 |
| 2.1.4 Small interfering RNA (siRNA)..... | 21 |
| 2.1.5 Mäuse | 21 |
| 2.1.6 Zellen | 22 |
| 2.1.7 Puffer und Stammlösungen | 23 |
| 2.1.8 Materialien und Geräte | 28 |
| 2.2 Methoden <i>in vivo</i> – Tierversuche | 31 |
| 2.2.1 Genotypisierung von Mäusen | 31 |
| 2.2.1.1 DNA-Isolation aus Mausschwanzbiopsien | 31 |
| 2.2.1.2 Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 32 |
| 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.2.2 Auslösung einer systemischen Inflamationsantwort durch LPS-Injektion | 33 |
| 2.2.3 <i>In-vivo</i> -Permeabilitätsassay mit Evans Blue (<i>Organ Leakage Assay</i>) | 33 |
| 2.2.3.1 Organ Leakage Assay mit AICAR | 34 |
| 2.2.4 Überlebensstudie | 34 |
| 2.2.4.1 Dosisstudie | 34 |
| 2.2.4.2 Überlebensstudie..... | 35 |
| 2.2.5 IHC..... | 35 |
| 2.2.5.1 Blutentnahme und Perfusion von Mäusen für IHC | 35 |
| 2.2.5.2 Einbetten von Organen in Paraffin und Herstellen von Paraffinschnitten | 35 |
| 2.2.5.3 Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten | 36 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.5.4 | Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung | 36 |
| 2.2.5.5 | IHC mit Fluoreszenzmarkierungen..... | 37 |
| 2.2.6 | Leberentnahme für Western Blot und Zytokinmessung | 37 |
| 2.2.6.1 | Herstellen von Leberlysaten für Western Blot | 38 |
| 2.2.6.2 | Herstellen von Leberlysaten für Zytokinmessung..... | 38 |
| 2.2.7 | Gewinnung von Plasma für Messung verschiedener Plasmaparameter | 38 |
| 2.2.8 | Messung von Leberfunktionsparametern..... | 39 |
| 2.2.9 | Zytokinmessung mittels BD™ <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)..... | 39 |
| 2.3 | Methoden <i>in vitro</i>..... | 40 |
| 2.3.1 | Zellkultur | 40 |
| 2.3.1.1 | Präparation von HUVEC | 40 |
| 2.3.1.2 | Kultivierung und Aussaat von HUVEC | 41 |
| 2.3.1.3 | Transfektion von HUVEC..... | 41 |
| 2.3.2 | Herstellung von Endothelzelllysaten für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot | 43 |
| 2.3.3 | Proteinbestimmung nach Lowry | 44 |
| 2.3.4 | Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE..... | 44 |
| 2.3.5 | Western Blotting | 45 |
| 2.3.6 | Immundetektion von Proteinen | 45 |
| 2.3.7 | Strippen von Membranen | 46 |
| 2.3.8 | Densitometrische Auswertung der Western Blots | 46 |
| 2.3.9 | AMPK-Aktivitätsassay | 47 |
| 2.3.9.1 | IP der β 1-Untereinheit der AMPK | 47 |
| 2.3.9.2 | Aktivitätsassay | 48 |
| 2.3.10 | IF-Färbungen von HUVEC | 48 |
| 2.3.11 | Durchflusszytometrie | 49 |
| 2.3.11.1 | Durchflusszytometrie mit AMPK-Aktivatoren..... | 49 |
| 2.3.11.2 | Durchflusszytometrie mit transfizierten HUVEC | 50 |
| 2.3.12 | Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) | 50 |
| 2.3.12.1 | ECIS mit transfizierten HUVEC..... | 51 |
| 2.3.12.2 | ECIS mit AICAR | 52 |
| 2.4 | Statistische Auswertung | 52 |
| 3 | ERGEBNISSE | 53 |
| 3.1 | Beeinflussung einer systemischen Entzündungsreaktion durch AMPKα1 <i>in vivo</i>..... | 53 |
| 3.1.1 | Einfluss von AMPK α 1-KO auf die LPS-induzierte systemische Inflammas- antwort | 53 |
| 3.1.2 | Einfluss von AMPK α 1-KO auf das Überleben nach LPS-Injektion | 54 |
| 3.1.3 | Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Permeabilität der Gefäße | 55 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.4 | Einfluss von AMPK α 1-KO und LPS auf Zytokinexpression und Leukozyten-einwanderung in der Leber | 57 |
| 3.1.5 | Einfluss des AMPK α 1-KO auf Zellschädigung | 60 |
| 3.1.6 | Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Veränderungen der CD31-Expression in der Leber | 61 |
| 3.1.7 | Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Veränderungen der Expression von Claudin-5 in der Leber | 62 |
| 3.2 | Wirkung proinflammatorischer Mediatoren auf HUVEC | 63 |
| 3.2.1 | Proinflammatorische Signalwege in HUVEC | 64 |
| 3.2.2 | Expression von Adhäsionsmolekülen in HUVEC | 65 |
| 3.2.3 | Beeinflussung der Barrierefunktion durch proinflammatorische Mediatoren in HUVEC | 66 |
| 3.3 | Proinflammatorische Mediatoren und AMPK-Aktivität in HUVEC | 67 |
| 3.3.1 | AMPK-Phosphorylierung und -Aktivität nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Kurzzeit-Experimente) | 67 |
| 3.3.2 | AMPK-Aktivierbarkeit nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Langzeit-Experimente) | 70 |
| 3.3.3 | Einfluss der AMPK auf Zytokin-induzierte Adhäsionsmolekülexpression | 71 |
| 3.3.4 | Einfluss der AMPK auf die Zytokin-vermittelte Barriestörung von HUVEC | 74 |
| 3.3.5 | Einfluss von AMPK auf Claudin-5-Expression und –Reduktion nach inflammatorischen Mediatoren | 75 |
| 3.4 | Einfluss von AMPK-Aktivierung auf LPS-induzierte Permeabilitätserhöhung <i>in vivo</i> | 76 |
| 4 | DISKUSSION | 78 |
| 4.1 | Weibliche AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen nach LPS-Injektion eine verstärkte systemische Entzündung und eine erhöhte Mortalität | 78 |
| 4.2 | AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine erhöhte LPS-induzierte vaskuläre Permeabilität in der Leber | 80 |
| 4.3 | AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine verstärkte Leberschädigung | 82 |
| 4.4 | AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine stärkere Verminderung der Claudin-5-Expression nach LPS | 84 |
| 4.5 | HUVEC sind als Modell zur Untersuchung der Regulation inflammatorischer Prozesse geeignet | 86 |
| 4.6 | Proinflammatorische Mediatoren verändern das Phosphorylierungsmuster der AMPK | 86 |
| 4.7 | Eine Aktivierung der AMPK bewirkt eine Verminderung der Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen <i>in vitro</i> | 88 |
| 4.8 | Eine AMPK-Aktivierung nicht aber eine Herunterregulierung der AMPK α 1 beeinflusst die Zytokin-vermittelte Barriestörung <i>in vitro</i> | 90 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.9 | Eine Herunterregulierung der AMPK α 1 <i>in vitro</i> beeinflusst die Claudin-5-Expression | 91 |
| 4.10 | Die Aktivierung der AMPK reduziert die Zytokin-vermittelte Barriestörung <i>in vivo</i> | 94 |
| 4.11 | Ausblick | 97 |
| 5 | LITERATUR | 98 |
| 6 | ANHANG | 110 |
| 6.1. | Abkürzungsverzeichnis..... | 110 |
| 6.2 | Supplement | 113 |
| 6.2.1 | Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in HUVEC durch IL-1 β , TNF- α und LPS – zusätzliche Daten zu 3.2.1 | 113 |
| 6.2.2 | Expression von Adhäsionsmolekülen in HUVEC durch IL-1 β , TNF- α und LPS – zusätzliche Daten zu 3.2.2 | 114 |
| 6.2.3 | AMPK-Aktivierbarkeit nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Langzeit-Experimente) – zusätzliche Daten zu 3.3.2..... | 115 |
| 6.3 | Abbildungsverzeichnis..... | 116 |
| 6.4 | Tabellenverzeichnis..... | 118 |
| 6.5 | Danksagung | 119 |
| 6.6 | Ehrenwörtliche Erklärung | 120 |
| 6.7 | Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Daten dieser Arbeit..... | 121 |

1 Einleitung

1.1 Endothel

Im Jahr 1865 führte Wilhelm His den Begriff „Endothel“ ein, der die Zellschicht bezeichnet, welche das Innere der Blutgefäße auskleidet [1] (Abbildung 1). Im Körper eines erwachsenen Menschen befinden sich ungefähr 10^{13} Endothelzellen [2], die insgesamt eine Fläche von 4000 - 7000 m² bedecken [3] und etwa 1 kg wiegen [2]. Den größten Anteil haben dabei die Zellen der Kapillaren, welche für den Austausch von Stoffen verantwortlich sind und in allen Geweben des Körpers vorkommen (Abbildung 1) [4]. Früher wurde die Endothelschicht als inerte Auskleidung von Blutgefäßen angesehen [5], deren einzige Aufgabe darin besteht, das Blut und das die Blutgefäße umgebende Gewebe voneinander zu trennen [1,2]. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass Endothelzellen hoch aktiv sind [4] und neben der Barrierefunktion viele wichtige Aufgaben übernehmen. Dazu gehören die Kontrolle des vasomotorischen Tonus und die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase [3,6]. Endothelzellen stehen dabei im engen aktiven Kontakt mit Blut- und Gefäßwandzellen sowie mit Proteinen des Plasmas und der interstitiellen Flüssigkeit.

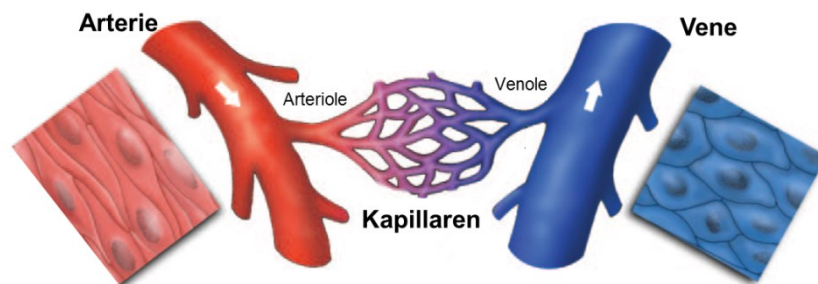


Abbildung 1: Komponenten des Gefäßsystems. Das Gefäßsystem besteht aus mehreren Komponenten. Dazu gehören die das Blut zu den Organen transportierenden Arterien mit langen, schmalen Endothelzellen, welche viele *tight junctions* aufweisen und die das Blut zum Herzen zurück transportierenden Venen mit breiteren, kleineren Endothelzellen. Zudem gehören die kleinsten Einheiten – die Kapillaren – dazu, welche für die Blutversorgung und den Stoffaustausch zuständig sind und sich phänotypisch je nach Umgebung stark voneinander unterscheiden (verändert nach [6]).

Die vielfältigen Funktionen der Endothelzellen gehen mit einer großen strukturellen Heterogenität einher [1,6]. So unterscheiden sich nicht nur die Zellen aus unterschiedlichen Gefäßtypen, also Arterien, Venen und Kapillaren, sondern auch die Zellen aus verschiedenen Organen [1,6]. Diese große Diversität führt dazu, dass es nur wenige Endothelzellmarker gibt, die auf allen Endothelzellen exprimiert werden. Einer davon ist *cluster of differentiation 31* (CD31), auch *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) genannt [1,7,8]. Es handelt sich dabei um ein Transmembran-Immunglobulin (Ig), welches an interzellulären Endothelzell-Kontakten aufzufinden ist. Andere endothelspezifische Proteine sind das *tight junction*-Protein Claudin-5 [8,9], sowie *vascular-*

endothelial cadherin (VE-Cadherin), welches in den Adhäsionsverbindungen zu finden ist [8,10].

Wie erwähnt, zeigen Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßtypen und Geweben unterschiedliche morphologische Charakteristika [1,11] (Abbildung 2). So zeichnen sich Venen, Arterien und Kapillaren von Haut, Lunge und Herz durch nicht-fenestriertes, kontinuierliches Endothel aus. Fenestrierungen, bei denen es sich um Lücken mit einem Durchmesser von ca. 70 nm handelt und welche durch eine dünne Membran – ein sogenanntes Diaphragma – verschlossen sind [11], kommen dagegen im Endothel von Geweben vor, die wie Niere oder Darm eine hohe Permeationsrate aufweisen. Einen Sonderfall bildet die Leber mit ihrem diskontinuierlichen Endothel, welches 100-200 nm große Fenestrierungen ohne Membranen aufweist [1,6,12].

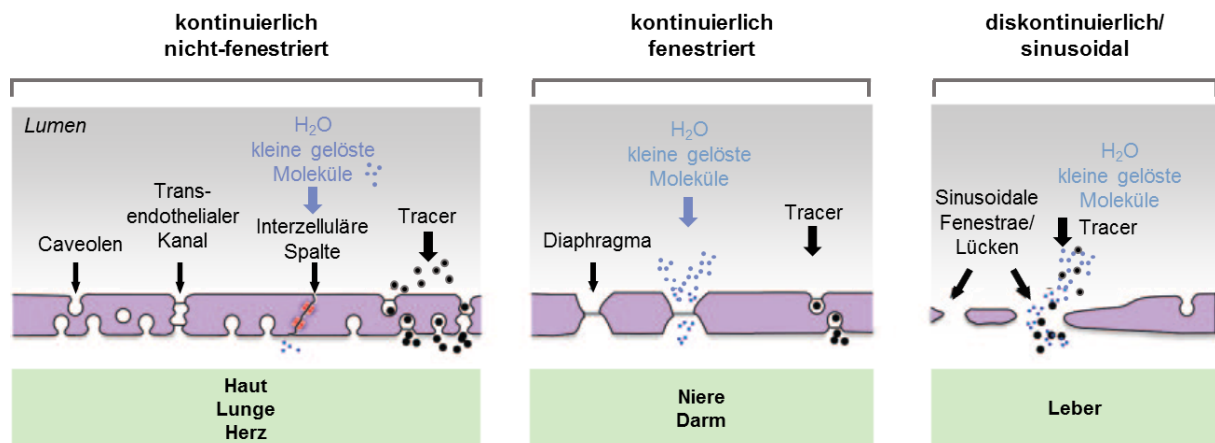


Abbildung 2: Phänotypische Unterschiede zwischen Endothelzellen unterschiedlicher vaskulärer Gebiete. Endothelzellen weisen je nach Umgebung eine hohe phänotypische Diversität auf. In den Gefäßen von Haut, Lunge und Herz findet sich durchgängiges, nicht-fenestriertes Endothel. In Organen mit hoher Filtrierrate wie Niere und Darm kommt fenestriertes Endothel vor, welches Lücken (Fenestrierungen) aufweist, die durch eine dünne Membran (Diaphragma) verschlossen sind. Einen Sonderfall bildet das sinusoidale Endothel der Leber, welches größere Fenestrierungen aufweist, die kein Diaphragma haben (verändert nach [1]).

Obwohl Endothelzellen *in vivo* eine hohe Diversität aufweisen, sind Endothelzellen aus der Nabelschnurvene ein vielfältig eingesetztes Zellmodell [1]. Die Isolationsmöglichkeit von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) wurde in den 1970ern von zwei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt [13,14]. Daraufhin wurden in den 1980er Jahren viele Endothelstudien begonnen, die uns helfen, dieses komplexe Organ zu verstehen [1,2].

1.2 Endothel und Entzündung

Das Endothel spielt beim Erhalt der vaskulären Homöostase eine wichtige Rolle und ist so auch im Rahmen von Inflammationsprozessen von großer Bedeutung. Im normalen

gesunden Zustand zeichnet sich das Endothel durch einen nicht-adhäsiven, anti-koagulanten Phänotyp aus [4]. Unter inflammatorischen Bedingungen lösen früh ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [15] über ihre Rezeptoren eine Aktivierung des Endothels aus [3,5,16]. Dadurch kommt es zur Initiierung von Stress-Signalwegen, zum Beispiel zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und *extracellular signal regulated*-Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) [17,18]. Über den MAPK-Signalweg wird durch IL-1 β , TNF- α und das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) der heterodimere Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'k-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) aktiviert [19–22], welcher für die Expression weiterer wichtiger proinflammatorischer Gene essentiell ist. Durch Initiierung verschiedener Signalwege kommt es in Endothelzellen zu einer Reihe von Veränderungen, die letztendlich das Ziel haben, die durch inflammatorische Stimuli gestörte Homöostase wiederherzustellen (Abbildung 3). Eine typische Entzündungsreaktion ist die NF- κ B-abhängige [18] Expression von Adhäsionsmolekülen [3–5] wie E-Selektin [23], *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) [24] oder *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) an der Oberfläche von Endothelzellen [25]. Dadurch wird die Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten zur Beseitigung der Infektion in das Gewebe ermöglicht [26,27]. Des Weiteren kommt es durch Kontraktion der Endothelzellen und durch Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen [28–30] zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität, wodurch der Eintritt von Flüssigkeit, Plasmaproteinen, inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen sowie von Leukozyten in das entzündete Gewebe ermöglicht wird [5,31–33]. Eine weitere Veränderung des Endothels ist der Wechsel vom antithrombotischen hin zum prothrombotischen Phänotyp, das heißt es kommt zur Herunterregulierung von antikoagulant Molekülen wie Thrombomodulin bei gleichzeitiger Heraufregulierung von prokoagulant Proteinen wie *tissue factor* (TF) [34–36]. Zudem können Endothelzellen auch Zytokine wie IL-6, IL-8 und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) produzieren [5].

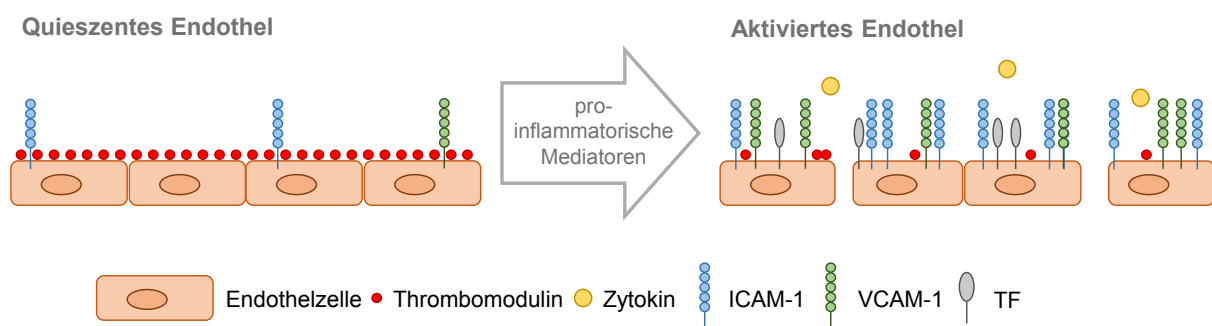


Abbildung 3: Veränderung des endothelialen Phänotyps nach Kontakt mit proinflammatorischen Mediatoren. Endothelzellen zeichnen sich im Normalzustand durch eine antikoagulante, antiadhäsive Oberfläche aus. Durch Stimulierung mit proinflammatorischen Mediatoren wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) induziert, welche zur Adhäsion von

Leukozyten führen. Des Weiteren verändert sich die Oberfläche hin zum koagulantem Phänotyp, was durch Heraufregulierung von *tissue factor* (TF) mit gleichzeitiger Herunterregulierung von anti-koagulantem Thrombomodulin vermittelt wird. Zudem schütten Endothelzellen Zytokine aus, welche zu einer Verstärkung der Entzündungsantwort führen. Die Barrierefunktion wird durch Lockerung der Zell-Zell-Kontakte geschwächt.

Unter streng regulierten Inflammationsbedingungen bleibt die Endothelaktivierung lokal und temporär begrenzt und ist reversibel. Gerät die Regulation jedoch außer Kontrolle, wie bei einer systemischen Entzündung, so tritt eine Dysfunktion des Endothels auf, die wiederum zum Krankheitsbild beiträgt. Die Endothelaktivierung verläuft dabei unkontrolliert, so dass sie den homöostatischen Zustand weiter stört, statt ihn wiederherzustellen und insgesamt eine Schädigungsreaktion verstärkt wird [4,37]. Dabei spielen der Verlust der kontrollierten Barrierefunktion mit nachfolgender Ödembildung und die Rekrutierung der gewebeschädigenden Leukozyten eine wichtige Rolle. Diese Veränderungen führen zur verminderten Durchblutung von Organen und bedingen deren Funktionsverlust. Darüber hinaus kann sich die lokal begrenzte Koagulation zur disseminierten Koagulation ausbreiten. Somit trägt die endotheliale Dysfunktion direkt zur Krankheitsschwere und Mortalität unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung bei.

1.3 Endothel und Barriere

Wie in Abschnitt 1.1 und 1.2 erwähnt, ist die Aufrechterhaltung einer Barriere zwischen Gefäßlumen und umgebendem Gewebe eine wichtige Funktion von Endothelzellen, die als erste entdeckt wurde und auf die Endothelzellen zunächst reduziert wurden. Die endotheliale Barriere ist semipermeabel und erlaubt den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, gelösten Stoffen und Ionen [1,3,38]. Dieser bidirektionale Stoff- und Flüssigkeitsaustausch muss besonders im kapillaren Bereich gewährleistet sein, da hier die direkte Versorgung der Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff stattfindet [1]. Dabei gibt es verschiedene Transportwege vom Blut in das zu versorgende Gewebe (Abbildung 4). Flüssigkeiten und kleine gelöste Moleküle passieren die Endothelschicht meist passiv auf parazellulärem Weg zwischen zwei aneinandergrenzenden Endothelzellen [1,8]. Die Selektivität der Barriere wird dabei durch Zell-Zell-Verbindungen gewährleistet. Dazu gehören Adhäsionsverbindungen, die durch Proteine wie VE-Cadherin gebildet werden und über β -Catenin mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Besonders wichtig für die Kontrolle des parazellulären Transports sind die auch unter dem Namen *zona occludens* oder *tight junctions* bekannten dichten Zellverbindungen [1]. Die Anzahl und die Komplexität dieser Verbindungen sind invers proportional zur endothelialen Permeabilität [1]. *Tight junctions* werden von Proteinen wie Claudin-5 und Occludin ausgebildet und stehen über Adaptermoleküle wie Zona Occludens-1 (ZO-1) direkt mit dem Zytoskelett in Kontakt [8,31,39]. Generell sind Endothelzellen in Arteriolen stärker miteinander verbunden, während die Verbindungen in Venolen lockerer

sind. Durch Anwesenheit von Fenestrierungen im kontinuierlichen Endothel wird die Durchlässigkeit für Flüssigkeiten und gelöste Stoffe erhöht, während sie für Makromoleküle unverändert bleibt [1].

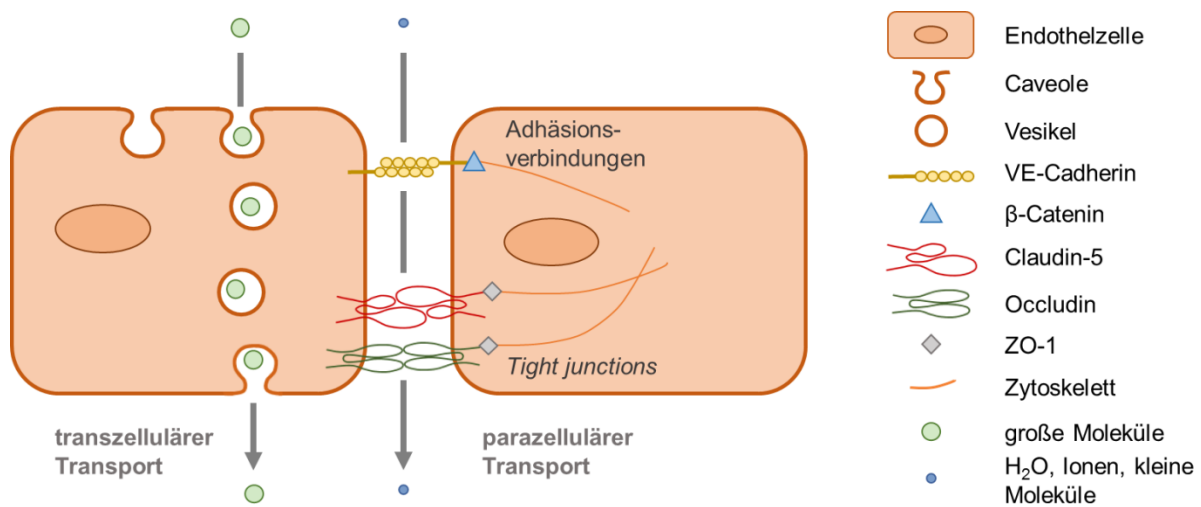


Abbildung 4: Transportwege für Moleküle durch die Endothelzell-Monolayer. Endothelzellen sind durch Adhäsionsverbindungen (ausgebildet von *vascular-endothelial cadherin* (VE-Cadherin)) und *tight junctions* (ausgebildet von Claudin-5 oder Occludin) miteinander verbunden. Über Adaptermoleküle wie β-Catenin oder Zona Occludens-1 (ZO-1) stehen diese Zell-Zell-Verbindungen mit dem Zytoskelett in Kontakt. Adhäsionsverbindungen und *tight junctions* kontrollieren den Transport kleiner Moleküle auf parazellulärem Wege. Große Moleküle wie zum Beispiel Albumin werden auf transzellulärem Transportweg transportiert. Sie werden über Caveolen in die Zelle aufgenommen, über die daraus gebildeten Vesikel durch die Zelle transportiert und schließlich über Exozytose freigesetzt (nach [40]).

Ein weiterer Transportweg ist der transzelluläre Weg, also ein Transport durch die Endothelzellen hindurch [1,8,41,42]. Über diesen Weg werden Makromoleküle ausgetauscht, die aufgrund ihrer Größe nicht parazellulär die Barriere passieren können. Ein wichtiges Beispiel dafür ist Albumin, ein Plasmaprotein, welches über Caveolen bidirektional durch die Endothelzellschicht transportiert wird [40,43,44].

Die in 1.2 beschriebene unter Inflammationsbedingungen ausgelöste Permeabilitätserhöhung des Endothels findet vorwiegend in postkapillaren Venolen statt [1]. Vor allem der parazelluläre Transportweg wird durch Kontraktion des endothelialen Zytoskeletts und nachfolgende Lockerungen der Zell-Zell-Kontakte erhöht, so dass auch größere Moleküle wie Albumin parazellulär die Endothelschicht passieren können [40,45]. Unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung tritt diese Barrierestörung auch in anderen Bereichen des Gefäßsystems wie in großen Venen, Arterien und Kapillaren auf [1]. So kommt es zur verstärkten Bildung von Ödemen, welche die Sauerstoffzufuhr der Organe behindern und somit zu deren Funktionsstörung beitragen.

1.4 Systemische Entzündung und Sepsis

Das Phänomen der Entzündung ist schon seit Tausenden von Jahren bekannt und wurde vom römischen Arzt Cornelius Celsus im ersten Jahrhundert n. Chr. mit den vier typischen Anzeichen *rubor*, *tumor*, *calor* und *dolor* (Rötung, Schwellung, Wärme und Schmerz) beschrieben [46]. 1858 wurde von Rudolph Virchow das fünfte Anzeichen *functio laesa* (Funktionsverlust) hinzugefügt [46]. Eine Entzündungsantwort wird durch Pathogene ausgelöst, die von körpereigenen Zellen als sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkannt werden. Dazu gehören Oberflächenmoleküle wie das in der Zellwand gram-negativer Bakterien vorkommende LPS [17,21]. Zudem können auch Schädigungen wie Trauma und Gewebsverletzung über endogen freigesetzte intrazelluläre Moleküle, den sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), zur Auslösung einer Entzündungsantwort führen [47,48].

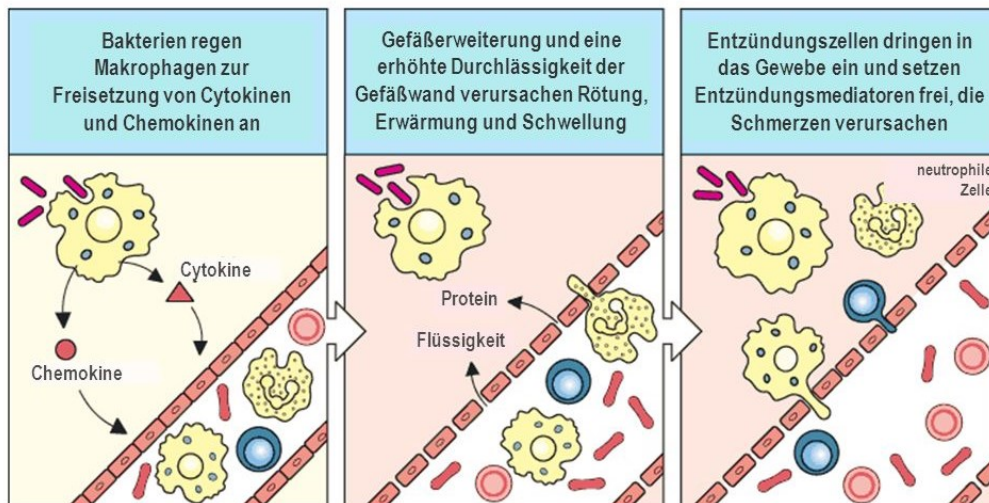


Abbildung 5: Ablauf einer Entzündungsreaktion. Nach Eindringen von Pathogenen wie Bakterien, werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) – wie zum Beispiel das Oberflächenmolekül Lipopolysaccharid (LPS) – von Makrophagen erkannt, woraufhin diese proinflammatorische Mediatoren wie Chemokine und Zytokine ausschütten. Diese wiederum aktivieren das Endothel, welches für Proteine und Flüssigkeit durchlässig wird und durch Expression von Adhäsionsmolekülen die Migration von Leukozyten in das infizierte Gewebe ermöglicht. Diese Reaktionen führen zu den typischen Anzeichen einer Entzündung: Rötung, Wärme, Schwellung und Schmerz [49].

DAMPs und PAMPs werden im Körper von den Zellen der angeborenen Immunabwehr, vor allem von Makrophagen, über ihre Oberflächenrezeptoren erkannt, was zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen führt. Diese proinflammatorischen Mediatoren aktivieren zum einen das Endothel, wodurch es zu den in 1.2 beschriebenen Veränderungen kommt. Zum anderen führen sie zur Aktivierung weiterer Immunzellen, die durch das Endothel in das betroffene Gewebe einwandern und die

Pathogene beseitigen (Abbildung 5). Zudem wird durch proinflammatorische Mediatoren auch die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren ausgelöst und die Entzündung wieder aufgelöst, sobald die Infektion beseitigt und das geschädigte Gewebe repariert ist [46]. Im Normalfall ist die Entzündungsreaktion streng reguliert und zeitlich sowie auch räumlich begrenzt [33].

Überschießende Pathogen-Belastung und/oder gestörte Kontrollmechanismen können eine systemische Entzündung induzieren, bei der die örtliche und zeitliche Begrenzung nicht mehr gegeben ist. Eine solche systemische Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) ist durch Symptome wie Hyper- oder Hypothermie ($>38,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$), erhöhte Herzrate (>90 Schläge/min), Schnellatmigkeit sowie Leukozytose oder Leukopenie (>12.000 weiße Blutzellen pro ml oder $<4000/\text{ml}$) gekennzeichnet [38,50–52]. Die klinischen Anzeichen variieren jedoch stark und sind von unterschiedlichen Faktoren wie Infektionsort, Art des Pathogens, Ausgangs-Gesundheitszustand und dem Zeitpunkt des Behandlungsbeginns abhängig [50].

Die komplexe systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf eine Infektion wird als Sepsis bezeichnet. Die beschriebenen Symptome des SIRS sind dabei mit einer vermuteten oder bestätigten Infektion verbunden [53,54] (Abbildung 6). Eine schwere Sepsis ist dadurch gekennzeichnet, dass es zum Versagen eines oder mehrerer Organe kommt. Bricht zudem noch der Kreislauf zusammen, wird vom septischen Schock gesprochen [53].

Sepsis und septischer Schock gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen in den Intensivstationen. Dies liegt unter anderem daran, dass die Diagnose einer Sepsis schwierig ist, da die Symptome vielfältig und nicht spezifisch sind [52,55], und es keine zuverlässigen Biomarker für Sepsis gibt [51]. Zudem existieren trotz intensiver, langjähriger Forschung keine spezifischen Therapiestrategien gegen Sepsis. Die Behandlung konzentriert sich auf möglichst frühzeitige Gabe von Antibiotika und schnelle Entfernung des Infektionsherdes. Zusätzlich werden Maßnahmen getroffen, welche den Kreislauf stabilisieren und versagende Organe unterstützen, also Flüssigkeitsgabe, Beatmung etc. [38,50,51].

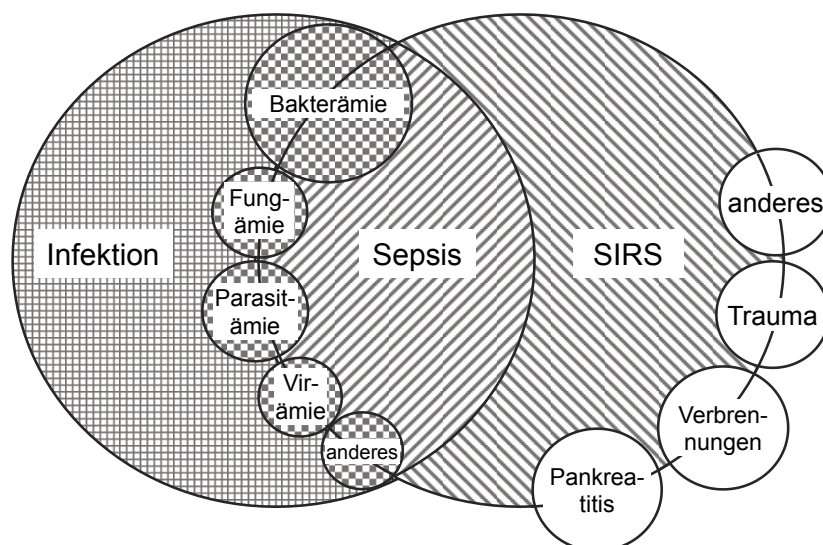


Abbildung 6: Abgrenzung und Schnittstellen von Sepsis, Infektion und systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Bei einer Infektion wird im Körper über die Erkennung eines Erregers eine Entzündungsantwort hervorgerufen. Diese läuft zeitlich und örtlich begrenzt ab. Dabei kann der Erreger teilweise im Blut nachweisbar sein (Bakterämie, Fungämie...), ohne dass es zu einer systemischen Entzündung kommt. SIRS kann nicht nur durch Pathogene sondern auch durch nicht-infektiöse Schädigungen wie Trauma oder Verbrennungen ausgelöst werden. An der Schnittstelle zwischen Infektion und SIRS befindet sich die Sepsis, die als SIRS mit einer bestätigten oder vermuteten Infektion definiert wird. Dabei treten sowohl klinische Anzeichen einer Infektion als auch die einer systemischen Entzündung auf, was die eindeutige Diagnose erschwert (nach [53]).

Nicht nur die Erkennung einer Sepsis ist schwierig, auch die Forschung an einer Sepsis-Therapie wird durch die Vielfältigkeit der Erreger und mangelnde Spezifität der Symptome erschwert. Für die Symptomatik ist das Zusammenspiel mehrerer Signalwege verantwortlich und die Konzentration auf ein einzelnes Molekül als Therapieziel reicht unter Umständen nicht aus [38]. Dazu kommt, dass Sepsis eine sehr heterogene Patientengruppe betrifft - von Säuglingen bis zu Menschen in hohem Alter - und insbesondere auch Patienten einschließt, die durch chronische Krankheiten vorbelastet sind [38]. Ein in Studien an einer homogenen Patientengruppe getestetes Medikament kann daher nur geringe Wirkung in anderen Populationen aufweisen [38].

1972 äußerte Thomas Lewis den Gedanken, dass weniger das Pathogen als vielmehr die Reaktion des Individuums für die Ausprägung und Schwere einer Sepsis verantwortlich ist. Daraufhin wurde der Fokus der Forschung auf die Behandlung einer überschießenden proinflammatorischen Immunantwort gelegt [54]. Da zu späteren Zeitpunkten einer Sepsis aber auch das Problem der übermäßigen antiinflammatorischen Immunantwort auftritt, wodurch es zur Immunparalyse und damit einhergehend zur Begünstigung von Sekundärinfektionen kommt, erwies sich die Inhibierung proinflammatorischer Signalwege

als kontraproduktiv [56] und Ansätze wie die Hemmung von TNF- α konnten sich in der Praxis nicht bewähren.

Ein weiterer wichtiger Punkt für neue Forschungsansätze ist der Gedanke, dass Merkmale der Sepsis wie die mikrovaskuläre Dysfunktion basierend auf einer endothelialen Dysfunktion (siehe 1.2) nicht nur Begleiterscheinung sind, sondern grundlegend die Morbidität und Mortalität beeinflussen [31,57] und die Grundlage für Organversagen darstellen [29,38,45,50]. Infolge von mikrovaskulärer Dysfunktion und Ödembildung verlieren Zellen im Gewebeverband ihre spezialisierte Funktion und verursachen so die bei einer Sepsis auftretenden Organkomplikationen [38]. Eine Therapie, welche zum Beispiel für die Aufrechterhaltung der Integrität und Barrierefunktion des Endothels sorgt, könnte Komplikationen wie Ödembildung und Zusammenbruch der Organperfusion verhindern oder zumindest verringern [38].

1.5 Struktur, Aktivierung und Funktion der AMPK

Im Jahr 1973 wurde von der Gruppe um Kim eine Kinase entdeckt, welche durch Phosphorylierung zur Hemmung der Acetyl-CoenzymA-Carboxylase (ACC) führt [58]. Im gleichen Jahr beschrieben Beg et. al eine Kinase, die eine hemmende Phosphorylierung der 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR) vermittelt [59]. Erst Ende der 1980er Jahre stellte sich heraus, dass es sich bei beiden Kinasen um ein- und dasselbe Enzym handelte [60] – eine Serin/Threonin-Kinase, welche dann nach ihrem Coaktivator AMP AMP-aktivierte Proteinkinase, kurz AMPK, benannt wurde.

Die AMPK ist ein heterotrimeres Enzym, das aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen Untereinheiten β und γ besteht [61–65]. Die α -Untereinheit existiert in zwei Isoformen, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die sich unter anderem durch ihre Lokalisation in der Zelle unterscheiden. So liegt die $\alpha 1$ -Untereinheit zytosolisch vor, während die $\alpha 2$ -Untereinheit in den Kern translozieren kann [62,66]. Auch von den regulatorischen Untereinheiten gibt es Isoformen und Spleißvarianten ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$), was insgesamt die Ausbildung 12 verschiedener AMPK-Komplexe ermöglicht [62,67]. Die AMPK muss zum Erreichen ihrer maximalen Aktivität als Holoenzym aus allen drei Untereinheiten vorliegen [64]. Dabei dient die β -Untereinheit als *Scaffold* und bindet an die C-Termini von α - und γ -Untereinheit. Die γ -Untereinheit ist aufgrund ihrer Bindestelle für AMP an der allosterischen Aktivierung des Enzyms beteiligt [67] (Abbildung 7).

Durch Bindung von AMP an die γ -Untereinheit kommt es zu einer fünffachen Aktivitätssteigerung des Enzyms [64]. Zur vollständigen Aktivierung muss der Threonin 172 (T172)-Rest der katalytischen α -Untereinheit der AMPK phosphoryliert werden, wodurch die

Enzymaktivität auf das insgesamt Tausendfache gesteigert wird [63] (Abbildung 7). Die T172-Phosphorylierung wird zum einen durch Leber-Kinase B1 (LKB1) [68,69] und zum anderen kalziumabhängig durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase Kinase β (CaMKK β) vermittelt [70–72]. Eine dritte Kinase, von der in der Literatur berichtet wird, dass sie AMPK am T172-Rest phosphorylieren kann, ist *tumor growth factor*- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) [73,74]. Die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierung ist jedoch weitgehend unbekannt.

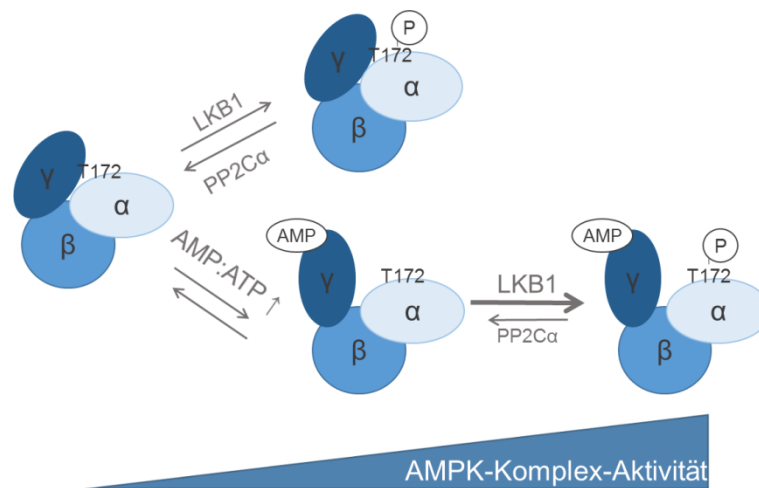


Abbildung 7: Aktivierung der AMPK durch AMP und Phosphorylierung. AMPK liegt als heterotrimeres Enzym aus einer katalytischen α - und zwei regulatorischen β - und γ -Untereinheiten vor. AMPK kann allosterisch durch an die γ -Untereinheit bindendes AMP aktiviert werden. Zur vollen Aktivierung muss jedoch der T172-Rest der katalytischen α -Untereinheit phosphoryliert werden. Basal befindet sich die AMPK in einem Zustand ständiger Phosphorylierung durch Leber-Kinase B1 (LKB1) und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatase 2C α (PP2C α). Bindet bei niedrigem Energiestatus in der Zelle AMP an die γ -Untereinheit, entsteht eine Konformationsänderung, welche die Zugänglichkeit für PP2C α erschwert. Somit kommt es netto zu einer Phosphorylierung des T172-Rest der AMPK α -Untereinheit und zu einer vollständigen Aktivierung des Enzyms (verändert nach [75]).

Zusätzlich zu der Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen kann AMPK über die Proteinphosphatase 2C α (PP2C α) dephosphoryliert werden. Unter Ruhebedingungen befindet sich AMPK in einem Zustand konstanter Phosphorylierung durch LKB1 und ständiger Dephosphorylierung durch PP2C α [67]. Ist der Energiestatus in der Zelle niedrig und somit das AMP:ATP-Verhältnis erhöht, kommt es zur Bindung von AMP an die AMPK γ -Untereinheit. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms und Einschränkung der Zugänglichkeit für PP2C α , wodurch es netto zu einer erhöhten T172-Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der AMPK durch LKB1 kommt [67,76] (Abbildung 7).

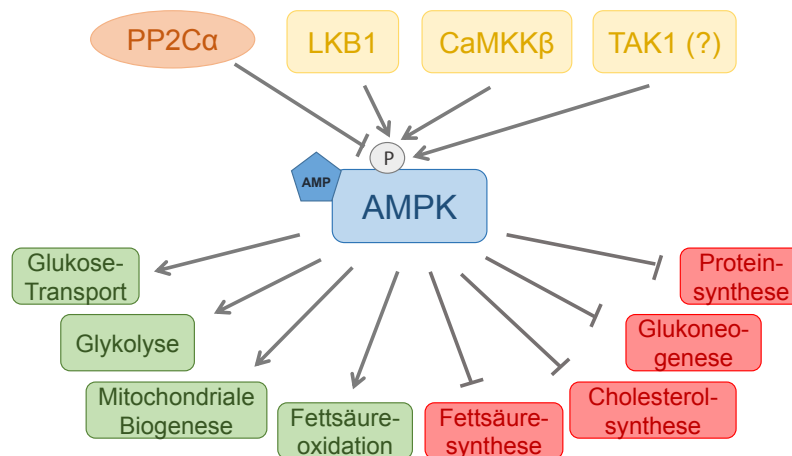


Abbildung 8: Aktivierung und Effekte der AMPK. AMPK wird durch Threonin 172 (T172)-Phosphorylierung der katalytischen α -Untereinheit aktiviert. Im Normalzustand befindet sich AMPK in einem Zustand ständiger Phosphorylierung durch Leber Kinase B1 (LKB1) und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatase 2 α (PP2C α). Eine Bindung des allosterischen Aktivators AMP begünstigt die Dephosphorylierung, netto kommt es zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung. Des Weiteren kann AMPK kalziumabhängig über die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Kinase Kinase β (CaMKK β) und zum anderen über die *tumor growth factor*- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) aktiviert werden, die physiologische Bedeutung letzterer ist nicht vollständig geklärt. Einmal aktiviert fördert AMPK ATP-liefernde Prozesse (grün) wie Glykolyse und Fettsäureoxidation, während ATP-verbrauchende, nicht lebenswichtige Prozesse wie Fettsäuresynthese und Cholesterolsynthese inaktiviert werden (rot) (nach [77]).

Die Zelle nutzt das AMP-ATP-System, um sich wie eine Batterie aufzuladen. Sie gewinnt durch die Hydrolyse von ATP ihre Energie [78], wodurch es zu einem gleichzeitigen Anstieg von AMP kommt. Ihre Fähigkeit auf den Energiestatus der Zelle zu reagieren, macht die AMPK zu einem perfekten Energiesensor [62,66,78]. Einmal aktiviert, bewirkt sie hemmende oder aktivierende Phosphorylierungen von Enzymen, Transkriptionsfaktoren oder anderen Zielproteinen. So kann sie über eine hemmende Phosphorylierung der ACC die Fettsäuresynthese oder über eine Hemmung der HMGCoA die Cholesterolsynthese inhibieren. Gleichzeitig kann AMPK über eine Hemmung der ACC die Fettsäureoxidation aktivieren oder durch aktivierende Phosphorylierung der Phosphofruktokinase-2 eine Erhöhung der Glykolyserate bewirken. AMPK aktiviert also energieliefernde Prozesse während sie zeitgleich energieverbrauchende Prozesse, die nicht akut für das Überleben der Zelle notwendig sind, inhibiert, [79] (Abbildung 8) und erhöht so netto den Energiestatus der Zelle.

Es gibt eine Reihe von pharmakologischen AMPK-Aktivatoren. Einer der bekanntesten ist 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR), welcher 1993 von von der Berghe patentiert wurde. AICAR wird per Nukleosidtransporter in die Zelle aufgenommen und dort über Adenosinkinase phosphoryliert. Dadurch entsteht ZMP, welches die Wirkung von AMP nachahmt [64]. Ein weiterer Aktivator ist A769662, wobei es sich um ein Thienopyridon handelt, welches ähnlich wie AMP die AMPK vor T172-Dephosphorylierung schützt [61,80]

Auch das Antidiabetikum Metformin kann AMPK aktivieren, was durch einen über Hemmung der Atmungskette ausgelösten Energiemangel hervorgerufen wird [81]. Ebenso können Naturstoffe wie Resveratrol zu einer AMPK-Aktivierung führen [80].

Dass AMPK für den Erhalt der Zellhomöostase wichtig ist, zeigt sich daran, dass eine niedrige AMPK-Aktivität mit metabolischen Syndromen wie Insulinresistenz und Fettleibigkeit korreliert [66,80]. Das bedeutet, dass AMPK sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle spielt [66].

1.6 AMPK im Endothel

Die AMPK ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym [62]. Lediglich die Prädominanz der Isoformen der katalytischen α -Untereinheit variiert. So wird die $\alpha 2$ -Untereinheit vor allem in Kardiomyozyten exprimiert [61,62]. In Fettgewebe, Skelettmuskel und auch im Endothel dominiert die $\alpha 1$ -Isoform [62]. In Endothelzellen wird auch die $\alpha 2$ -Isoform exprimiert [82], wobei in kultivierten Zellen das $\alpha 1$: $\alpha 2$ -Verhältnis schwanken kann [61]. Komplexe, welche die AMPK $\alpha 1$ -Isoform beinhalten, werden als weniger AMP-sensitiv bezeichnet [83].

Die Rolle der AMPK bei der Regulation des Metabolismus von Endothelzellen ist nicht vollständig geklärt [62], scheint aber von eher untergeordneter Bedeutung zu sein [84]. Das kann damit zusammenhängen, dass Endothelzellen im Gegensatz zu anderen Gewebezellen trotz ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff Energie hauptsächlich über aerobe Glykolyse und nicht über oxidative Phosphorylierung gewinnen. Sie befinden sich in einem sogenannten Zustand „metabolischer Hypoxie“ [85]. Auch Energiegewinnung aus Fettsäureoxidation spielt nur eine untergeordnete Rolle. So berichten Dagher et al., dass eine AMPK-Aktivierung durch AICAR oder Glukosemangel in Endothelzellen zu einer Erhöhung der Fettsäureoxidation durch Hemmung der ACC führt, diese aber nur wenig zum Gesamt-ATP-Gehalt beiträgt [86,87].

Dennoch ist AMPK im Endothel wichtig und trägt zum Erhalt der Zellfunktion bei [84]. Verschiedene Studien beschreiben zum Beispiel, dass AMPK durch Phosphorylierung zur Stimulierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) führt und durch Erhöhung der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion zur normalen Gefäßfunktion beiträgt [84,88–90]. Diese Daten konnten in der eigenen Arbeitsgruppe allerdings nicht bestätigt werden [91]. Des Weiteren wird berichtet, dass AMPK als Antwort auf Hypoxie an der Regulation der Angiogenese beteiligt und für die Rekrutierung von Blutgefäßen in ischämisches Gewebe verantwortlich ist [92]. Eine essentielle Bedeutung der AMPK im Rahmen der *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-stimulierten Angiogenese konnte *in vitro* und *in vivo* durch Studien der eigenen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [93]. Mit

Das Diagramm zeigt die zentrale Rolle von AMPK in der Endothelzellfunktion. AMPK (Aktive AMPK) ist im Zentrum dargestellt und reguliert verschiedene Prozesse:

- Entzündung:** AMPK inhibiert NF-κB, was die Entzündung reduziert.
- Angiogenese:** AMPK fördert die Angiogenese.
- Fettsäure-oxidation:** AMPK fördert die Fettsäure-oxidation.
- Gefäß-funktion:** AMPK fördert die Gefäß-funktion über eNOS und NO.
- Apoptose:** AMPK inhibiert die Apoptose.
- Oxidativer Stress:** AMPK inhibiert ROS, was den oxidativen Stress reduziert.

Die Legende definiert die Symbole:

- Endothelzelle
- Aktive AMPK (AMPK mit P)
- Adhäsions-moleküle
- Zytokin
- NF-κB
- ROS
- Mitochondrium
- Fettsäure
- eNOS
- NO

13

1.7 AMPK und Entzündung

Eine verminderte AMPK-Aktivität ist mit der Ausprägung von metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2 [66] assoziiert und scheint Endotheldysfunktion und kardiovaskuläre Krankheiten zu begünstigen. Bei all diesen Erkrankungen spielen entzündliche Prozesse eine Rolle [99]. Zum Beispiel werden bei Diabetes Mellitus Typ 2 durch zirkulierendes IL-6, TNF- α und freie Fettsäuren inflammatorische Kaskaden chronisch aktiviert [100]. Eine verringerte AMPK-Aktivität scheint also entzündliche Vorgänge zu fördern. Umgekehrt wurde gezeigt, dass AMPK-aktivierende Medikamente wie Metformin nicht nur metabolische Prozesse günstig beeinflussen, sondern auch inflammatorische Signalwege hemmen [101].

So kann AMPK mit dem inflammatorischen NF- κ B-Signalweg interferieren [62,102–104]. Dadurch wird zum Beispiel die durch NF- κ B induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche gehemmt [105,106] und die Leukozytenadhäsion und -transmigration verhindert [107]. Eine Aktivierung der AMPK kann beispielsweise die NF- κ B-Translokation in den Kern inhibieren, wie nach Einwirkung von freien Fettsäuren gezeigt wurde. Alternativ kann eine Hemmung von NF- κ B durch eine AMPK-vermittelte Phosphorylierung von p300 erfolgen. Damit wurde beispielsweise die Verhinderung der inflammatorischen Endothelantwort in TNF- α -stimulierten Endothelzellen nach AMPK-Aktivierung erklärt [79,96]. p300 ist ein transkriptioneller Coaktivator, dessen Phosphorylierung durch AMPK sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurde [108].

Studien in Makrophagen zeigen, dass AMPK die LPS-induzierte Expression von iNOS (induzierbare NO-Synthase) hemmen und auf diese Weise der Inflammationskaskade entgegenwirken kann. Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die AMPK-Aktivität durch proinflammatorische Signale gehemmt und durch antiinflammatorische Mediatoren erhöht wird [109]. Steinberg et al fanden heraus, dass TNF- α über eine Hochregulierung von PP2C zur AMPK-Inhibierung führt [110]. Auch eine Aktivierung von *Toll like receptor 4* (TLR4) durch LPS führt zum Verlust der T172-Phosphorylierung der AMPK [111]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass AMPK wichtig ist, um proinflammatorischen Prozessen entgegenzuwirken und ein Absinken der AMPK-Aktivität mit erhöhter Inflammation assoziiert ist [99].

1.8 Zielstellung

Die mikrovaskuläre Dysfunktion ist ein wesentliches Kennzeichen von SIRS und Sepsis und führt zu verminderter Organperfusion und nachfolgender Entstehung von Organversagen. Eines ihrer wesentlichen Charakteristika ist die Störung der endothelialen Barrierefunktion, welche auf einer endothelialen Dysfunktion beruht. Nach Literaturdaten schützt die in Endothelzellen exprimierte AMPK vor oxidativem und inflammatorischem Stress und trägt vermutlich zur Verhinderung oder Verminderung der Endotheldysfunktion bei. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob AMPK auch die endotheliale Barrierefunktion reguliert und so die mikrovaskuläre Dysfunktion sowie die Extravasation von Flüssigkeit und Blutzellen bei einer systemischen Entzündung in das Gewebe beeinflussen kann. Das Ziel des Projektes war es, zu untersuchen, ob AMPK inflammatorische Antworten des Endothels limitieren und die Entwicklung einer endothelialen beziehungsweise mikrovaskulären Dysfunktion im Rahmen einer systemischen Entzündungsantwort beeinflussen kann. Dazu wurden vor allem Untersuchungen zur Charakterisierung der mikrovaskulären Dysfunktion in AMPK α 1-*Knockout* (KO)-Mäusen durchgeführt. Dabei sollten insbesondere drei Fragen geklärt werden. Erstens: Wie wirkt sich eine Depletion von AMPK α 1 auf die Veränderungen der vaskulären Permeabilität bei systemischer Entzündung aus? Zweitens: Welche Mechanismen der Barriereregulation werden durch AMPK beeinflusst und welche antiinflammatorischen Wirkungen der AMPK sind nachweisbar? Und drittens: Kann eine AMPK-Aktivierung zur Verhinderung der endothelialen Barriestörung bei einer systemischen Entzündung führen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Für die Versuche dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| Aceton | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Acrylamid 4K-Lösung 30% Mix 29:1 | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Adenosinmonophosphat (AMP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Adenosintriphosphat (ATP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Agarose | Bio & SELL GmbH, Feucht/Nürnberg |
| Ammoniumpersulfat (APS) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| γ - ³² P-ATP | Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig |
| AURION BSA-c | AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Niederlande |
| Bio-Rad DC Protein Assay | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Bovines Serumalbumin Fraktion V pH 7,0 (BSA) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Bromphenolblau (BPB) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| DL-Dithiotreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Donkey-Serum | Merck Millipore GmbH, Darmstadt |
| DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents | GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK |
| Essigsäure 100%v | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Eosin Y Lösung, alkoholisch | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethanol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethylenglycol bis(2-aminoethylether) -N,N,N,N,-tetraacetat (EGTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| <i>Evans Blue</i> Fluka (EB) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Fluoromount-G® | Southern Biotech, Birmingham, AL, USA |
| Forene® | AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen |
| Formamid | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Gene Ruler™ DNA Ladder Mix | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Glukose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Glycerol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Glycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |

| | |
|--|--|
| Goat-Serum (Normal) | Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark |
| Hämatoxylin – Lösung nach Mayer | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Heparin-Natrium | Rotexmedica GmbH, Trittau |
| Humanes Serum Albumin (HSA) | Bayer Vital GmbH, Leverkusen |
| 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-(ethansulfonsäure)-Natriumsalz (HEPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) für Injektion | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H. |
| Kaliumchlorid (KCl) | VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Riedel-De Haen AG, Hannover |
| Kodak GBX developer and replenisher | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Kodak GBX fixer and replenisher | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Magermilchpulver | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl_2) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Magnesiumsulfat (MgSO_4) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-Mercaptoethanol (2-ME) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Methanol | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| 2-Methyl-1-propanol (Isobutanol) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN_3) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Natriumfluorid (NaF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Neo-Mount | Merck Millipore GmbH, Darmstadt |
| NP-40 | Calbiochem Merck KGaA, Darmstadt |
| Paraffin | Merck KGaA, Darmstadt |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Phosphorsäure, 85 % | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Proteinase K | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Protein-A-Sepharose von Staphylococcus Aureus (PAS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Red Safe™ | iNtRON Biotechnology, Korea |
| Salzsäure, rauchend (HCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| SAMS-Peptid (His-Met-Arg-Ser-Ala-Met-Ser-Gly-Leu-His-Leu-Val-Lys-Arg-Arg) | Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach |
| Scintillation Cocktail RotiSzint eco® plus LSC Universalcocktail | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260kDa) | Fermentas life science, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| TE-Puffer, endotoxinfrei | QIAGEN GmbH, Hilden |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Thrombin, Human Plasma | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trichloressigsäure (TCA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tri-Natriumcitrat Dihydrat Fluka | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Triton®X-100 | Ferak Berlin GmbH, Berlin |
| Tween®20 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Xylol | VWR International GmbH, Darmstadt |

2.1.2 Inhibitoren und Stimulanzen

Die in der Arbeit verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Inhibitoren und Stimulanzen

| Reagenz | Hersteller |
|--|---|
| A769662 | Abcam plc, Cambridge, UK |
| AICAR | Abcam plc, Cambridge, UK |
| Benzamidin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| IL-1 β | Thermo Fisher Scientific., Lafayette, CO. |
| LPS | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumdiphosphat tetrabasisch ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Complete, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets (PIC) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Trypsin-Inhibitor | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| TNF- α | ImmunoTools GmbH, Friesoythe |
| recombinant human VEGF ₁₆₅ | R & D Systems Minneapolis, USA No: 296-VE |

2.1.3 Antikörper

Die in den Versuchen der Arbeit verwendeten Antikörper sind Tabelle 3 bis Tabelle 11 zu entnehmen.

Die Primärantikörper für den Western Blot (Tabelle 3) wurden in 5 % BSA in TN/T-Puffer gelöst. Die Verdünnung richtete sich dabei nach dem Datenblatt. Um die Haltbarkeit der Antikörperlösungen zu verlängern und eine Verkeimungswahrscheinlichkeit zu verringern, wurden die Lösungen mit 0,02 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C gelagert. Sekundärantikörper für den Western Blot (Tabelle 4) wurden immer frisch in 5 % Milch in TN/T gelöst.

Nicht im Western Blot verwendete Antikörper wurden wie für die jeweilige Methode beschrieben eingesetzt.

Tabelle 3: Primärantikörper für Western Blot

| Antigen | Typ (IgG) | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|--|----------------------|--------|--------------|---|
| Phospho-ACC (S79) | Kaninchen polyklonal | 1:1000 | #3661 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| ACC | Kaninchen monoklonal | 1:1000 | #3676 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Phospho-AMPK (T172) | Kaninchen monoklonal | 1:1000 | #2535 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Phospho-AMPK (S485) | Kaninchen monoklonal | 1:1000 | #2537 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Pan AMPK | Kaninchen polyklonal | 1:1000 | #2532 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Phospho-p38 MAPK (T180/Y182) | Kaninchen monoklonal | 1:2000 | #4511 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204) | Maus monoklonal | 1:5000 | #9106 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| p44/42 MAPK (Erk1/2) | Maus monoklonal | 1:2000 | #9107 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| CD31 | Kaninchen polyklonal | 1:500 | AP06560 PU-N | Acris Antibodies GmbH, Herford |
| Claudin-5 | Kaninchen polyklonal | 1:2000 | LS-B3064 | LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA |
| β-Aktin | Kaninchen monoklonal | 1:5000 | #4970 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |

Tabelle 4: Sekundärantikörper für Western Blot

| Antigen | Typ (IgG) | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|--------------------------|--|---------|-----------|---|
| Anti-Maus IgG (H+L) | Ziege polyklonal, Peroxidase-gekoppelt | 1:10000 | #074-1806 | Kirkegaard & Perry, Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA |
| Anti-Kaninchen IgG (H+L) | Ziege polyklonal, Peroxidase-gekoppelt | 1:5000 | #074-1506 | Kirkegaard & Perry, Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA |

Tabelle 5: Antikörper für Immunpräzipitation (IP)

| Antigen | Typ (IgG) | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|-------------------|----------------------|--------|---------|--|
| AMPK β1 | Kaninchen polyklonal | 1:50 | #4182 | Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA |
| Normal rabbit-IgG | Kaninchen polyklonal | 1:200 | sc-2027 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A. |

Tabelle 6: Primärantikörper für Immunfluoreszenz (IF)

| Antigen | Typ (IgG) | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|---------|-----------------|--------|----------|---|
| ICAM-1 | Maus monoklonal | 1:50 | sc-8439 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A |
| VCAM-1 | Maus monoklonal | 1:50 | sc-13160 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A |

Tabelle 7: Sekundärantikörper für IF

| Typ | Fluorophor | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|-----------------|----------------|--------|---------|-----------------------------------|
| Ziege anti Maus | Cyanin 3 (Cy3) | 1:500 | A10521 | Life Technologies GmbH, Darmstadt |

Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie

| Antigen | Typ (IgG) | Fluorophor | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|---------|-----------------|--|-------------------------------|---------|--------------------------|
| ICAM-1 | Maus monoklonal | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> (FITC) | 20 µl /10 ⁶ Zellen | ab27582 | Abcam plc, Cambridge, UK |
| VCAM-1 | Maus monoklonal | Phycoerythrin (PE) | 20 µl /10 ⁶ Zellen | ab82438 | Abcam plc, Cambridge, UK |

Tabelle 9: Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC)

| Antigen | Typ (IgG) | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|--------------------------------|----------------------|--------|----------|---|
| CD 31 | Ratte monoklonal | 1:20 | DIA310 | Dianova GmbH, Hamburg |
| Claudin-5 | Kaninchen polyklonal | 1:500 | ab53765 | Abcam plc, Cambridge, UK |
| Claudin-5 | Kaninchen polyklonal | 1:50 | LS-B3064 | LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA |
| <i>polymorph-nuclear</i> (PMN) | Kaninchen polyklonal | 1:500 | AIA31140 | GENTAUR GmbH, Aachen |

Tabelle 10: Sekundärantikörper für IHC

| Typ | gekoppelt an | Verdg. | Kat.Nr. | Hersteller |
|----------------------|-----------------------|--------|-------------|--|
| Ziege anti Kaninchen | AlexaFluor 488(AF488) | 1:500 | A11034 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Esel anti Ratte | Biotin | 1:400 | 712-066-153 | Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA |
| Esel anti Kaninchen | Biotin | 1:400 | 711-066-152 | Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA |
| Streptavidin | Cy3 | 1:400 | 7100-12 | Southern Biotech, Birmingham, AL, USA |

Tabelle 11: Antikörper für die Zytokinmessung

| Flex Set | Katalognr. | |
|------------------------------|------------|--|
| Mouse IFN- γ Flex Set | 558296 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |
| Mouse IL-1 β Flex Set | 560232 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |
| Mouse IL-10 Flex Set | 558300 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |
| Mouse IL-6 Flex Set | 558301 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |
| Mouse MCP-1 Flex Set | 558342 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |
| Mouse TNF Flex Set | 558299 | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey. |

2.1.4 Small interfering RNA (siRNA)

Bei den verwendeten siRNAs (Tabelle 12) handelt es sich um SMARTpool® siRNAs. Dies bezeichnet eine Mischung aus 4 verschiedenen siRNAs, welche spezifisch gegen die Ziel-messenger RNA (mRNA) gerichtet sind. Durch die Verwendung mehrerer siRNAs, werden Nebenwirkungen reduziert.

Tabelle 12: siRNA

| Ziel | Design | Katalognummer | Hersteller |
|-----------------|--|----------------|--|
| Non (Kontrolle) | Dharmacon, On-Targetplus™ siCONTROL Non-targeting Pool | D-001810-10-20 | Thermo Fisher Scientific., Lafayette CO. |
| AMPK α 1 | Dharmacon, On-Targetplus™ SMARTpool® siRNA reagent | L-005027-00 | Thermo Fisher Scientific., Lafayette CO. |

2.1.5 Mäuse

In dieser Arbeit wurden AMPK α 1 KO-Mäuse und deren Wildtyp (WT)-Zuchtgeschwister verwendet. International sind sie unter dem Namen 129S2-Prkaa1^{tm1Sbj}/Orl verzeichnet. Sie haben einen 129S2/SvPas-Hintergrund und wurden von Benoit Viollet hergestellt. Die Zucht wurde mit heterozygoten Mäusen durchgeführt. Die Neugeborenen mussten genotypisiert werden.

Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind (Tabelle 13) zu entnehmen. Es wurde mit TE-Puffer eine 100 mM-Stammlösung hergestellt, welche zum Gebrauch 1:10 in TE-Puffer verdünnt wurde.

Tabelle 13: Primer für Genotypisierung

| Name | Primer | Ziel | Sequenz |
|---------------|----------------|---------------------------|---------------------------------|
| α WT F | <i>forward</i> | α 1 WT Allel | 5' AGCCGACTTTGGTAAGGATG3' |
| α WT R | <i>reverse</i> | α 1 WT Allel | 5' CCCACTTTCCATTTTCTCCA3' |
| IRES Fa2 | <i>forward</i> | α 1 mutantes Allel | 5' GGGCTGCAGGAATTTCGATATCAAGC3' |
| 3.0 Ra1 | <i>reverse</i> | α 1 mutantes Allel | 5' CCTTCCTGAAATGACTTCTGGTGC3' |

2.1.6 Zellen

In den Versuchen dieser Arbeit wurden HUVEC, also Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene verwendet. Die für die Kultur und Transfektion verwendeten Reagenzien sind Tabelle 14 und Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 14: Zellkultur- und Transfektionsreagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| Ciprofloxacin Kabi | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H. |
| Endotheliales Mitogen (EM) | Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA |
| Fötales Kälberserum (FKS) | Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien |
| Gelatine | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege |
| L-Glutamin | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege |
| <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS) | Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien |
| BioWhittaker® Humanserum | Lonza Walkersville Inc., Walkersville, USA |
| Kollagenase II | Worthington Biochemicals Corporation, Lakewood, USA |
| BioWhittaker® Medium 199 (M199) | Lonza Walkersville Inc., Walkersville, USA |
| Penicillin/Streptomycin | Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien |
| Saint-Red siRNA/RNAi-Delivery System | Synvolux Therapeutics B.V., Groningen, Belgien |
| Vitamin C (Ascorbinsäure) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

Tabelle 15: Zusammensetzung von Zellkulturmedien und -zusätzen

| | |
|--------------------------------|---|
| 0,02 % Kollagenase-Stammlösung | 1,5 mg Kollagenase in 7,5 ml M199 für Gebrauchslösung: 1:2 in M199 (entspricht 0,01 %) |
| Penicillin/Streptomycin-Zusatz | Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10000 µg/ml 1 ml der Penicillin/Streptomycin – Stammlsg pro 100 ml Medium |

| | |
|------------------------------|--|
| 200 mM Vitamin C-Stammlösung | frisch ansetzen 200 mM Vitamin C in M199 neutralisieren mit 0,2 N NaOH in 0,5 ml ddH ₂ O |
| Gelatine-Stammlösung | 0,2 % Gelatine bei 56 °C lösen, sterilfiltrieren Aufbewahrung bei 4 °C |
| serumfreies Medium | 0,25 % HSA in M199 |
| Stoppmedium | 10 % FKS in M199 |
| Wachstumsmedium (Aussaat) | 17,5 % FKS 2,5 % Humanserum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 680 µM L-Glutamin 25 µg/ml Heparin 7,5 µg/ml Endotheliales Mitogen 5 µg/ml Vitamin C in M199 |
| Wachstumsmedium (Kultur) | Wachstumsmedium 10 µg/ml Ciprofloxacin |
| serumarmes Wachstumsmedium | 2 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 680 µM L-Glutamin 25 µg/ml Heparin 7,5 µg/ml Endothelial Mitogen 5 µg/ml Vitamin C in M199 |

2.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer (Tabelle 16) wurden – wenn nicht näher bezeichnet – mit ddH₂O hergestellt.

Tabelle 16: Puffer und Stammlösungen

| | |
|---------------------------------|---|
| Aktivitätsassay-Waschpuffer | 40mM Hepes-Natrium, pH 7.0 200 µM AMP 80 mM NaCl 8 % (v/v) Glycerol 0,8 mM EDTA 0,8 mM DTT 5 mM MgCl ₂ 3-fach Reaktionspuffer herstellen bei -80 °C lagern |
| Aktivitätsassay-Reaktionspuffer | 200 µM SAMS-Peptid 200 µM ATP davon 1 µCi [γ- ³² P]-ATP in Aktivitätsassay-Waschpuffer |
| 10 % APS | 0,5 g APS in 5 ml ddH ₂ O |

| | |
|---------------------------------------|---|
| Blockierungspuffer (Western Blot) | 5 % Magermilchpulver 0,1 % Tween®20 in TN-Gebrauchspuffer |
| Blockierungslösung IF | 1 % BSA-c 5 % Goat-Serum in PBS |
| Blockierungslösung IHC | 5 % Goat- oder Donkey-Serum 0,1 % BSA-c in PBS-T |
| 10x Blottingpuffer | 250 mM Tris 1920 mM Glycin für Gebrauchspuffer (Blotting-Puffer): 1:10 Methanol 10 % |
| 3 % BPB-Stammlösung | 30 mg BPB in 1 ml PBS Aufbewahrung bei 4 °C |
| 100 mM CaCl ₂ -Stammlösung | 2,19 g CaCl ₂ in 100 ml ddH ₂ O Aufbewahrung bei 4 °C |
| Citratpuffer | 0,01 M tri-Natriumcitrat Dihydrat pH 6,0 |
| DEPC-Wasser | 1 ml DEPC in 1 l ddH ₂ O, über Nacht rühren, autoklavieren, Aufbewahrung bei 4 °C |
| 10X Elektrodenpuffer | 1920 mM Tris 250 mM Glycin 1 % SDS pH 8,3 für Gebrauchspuffer (Elektroden-Puffer): 1:10 Aufbewahrung bei Raumtemperatur |
| 0,5 % <i>Evans Blue</i> -Stammlösung | 5 mg <i>Evans Blue</i> in 1 ml PBS sterilfiltrieren, Aufbewahrung bei 4 °C |
| Hepes/CaCl ₂ /HSA | 1,5 mM CaCl ₂ 0,25 % HSA in Hepes-Puffer (pH 7,4) frisch ansetzen |
| Hepes-Puffer | 145 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 10 mM Hepes-Puffersubstanz 10 mM Glucose pH 7,4, sterilfiltrieren Aufbewahrung bei 4 °C |
| IP-Lysepuffer | 0,1 mM PMSF PIC 10 µl/ml 0,157 mg/ml Benzamidin in IP-Wasch- Lysepuffer II |

| | |
|---|--|
| IP-Wasch-Lysepuffer | 50 mM Hepes-Puffersubstanz pH 7,5 50 mM NaF 1 mM EDTA Aufbewahrung bei 4 °C frisch zusetzen: 1 mM DTT 5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ |
| IP-Wasch-Lysepuffer II | 1 % Triton-X100 10 % Glycerol In IP-Wasch-Lysepuffer |
| 3x Laemmli-Puffer | 9 % SDS 15 % Glycerol 186 mM Tris pH 6,8 10 mM EDTA frisch zusetzen: 6 % 2-ME 0,03 % BPB Aufbewahrung bei -20 °C |
| Lyse-Puffer | 1 % Triton X-100 0,1 % SDS in Wasch-Lysepuffer kurz vor Gebrauch zusetzen: 0,2 M PMSF (5 µl/ml) 10 µl/ml PIC |
| Lysepuffer für Leberlysate (Western Blot) | 50 mM Tris 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 1 mM Na ₃ VO ₄ 50 mM NaF 5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ·x10H ₂ O 0,27 M Sucrose pH 7,5 vor Gebrauch frisch zusetzen: 0,1 % 2-ME 0,2 mM PMSF 10 µl/ml PIC |
| Lysepuffer für Leberlysate (Zytokinbestimmung) | 10 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM EDTA 10 % Glycerol vor Gebrauch frisch zusetzen: 1% NP-40 10 µl/ml PIC |
| 0,9 % NaCl für Zellkultur | 9 g NaCl in 1 l H ₂ O autoklavieren |
| 50 % PAS | 100 mg PAS einwiegen, in 1 ml IP-Wasch- Lysepuffer, über Nacht quellen lassen gequollene PAS wiegen und Volumen in µl entsprechend dem Gewicht in mg an IP-Wasch- Lysepuffer zugeben |

| | |
|--|---|
| <i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i> | 145 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4, autoklavieren Aufbewahrung bei 4 °C |
| PBS für PFA | <u>Stock-I (Base):</u> 1 M Na_2HPO_4 anhyd. 1,36 M NaCl <u>Stock-II (Säure):</u> 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1,36 M NaCl <u>ansetzen:</u> 700 ml ddH ₂ O 17,5 ml Stock II mit Stock I auf pH 7,4 titrieren auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen |
| PBS-BSA | 0,2 % BSA-c in PBS |
| PBS/T (PBS-Triton)-Puffer | 0,01 % Triton X-100 in PBS Aufbewahrung bei 4 °C |
| 4 % PFA | 40 g PFA in 400 ml ddH ₂ O lösen bei ca. 60 °C mit 4 Tropfen NaOH klären mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen 500 ml PBS für PFA vorlegen 500 ml gelöstes PFA dazu filtrieren Aufbewahrung bei -20°C |
| 0,75 % Phosphorsäure | 0,89 ml Phosphorsäure 85 % auf 100 ml ddH ₂ O |
| Proteinstandard | 10 mg BSA in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung |
| Puffer für Primärantikörper-Inkubation (Western Blot) | 5 % BSA 0,1 % Tween®20 in TN-Gebrauchspuffer Aufbewahrung bei 4 °C |
| Puffer für Sekundärantikörper-Inkubation (Western Blot) | 5 % Magermilchpulver 0,1 % Tween®20 in TN-Gebrauchspuffer Aufbewahrung bei 4 °C |
| 10 % SDS-Stammlösung | 10 g SDS in 100 ml ddH ₂ O |
| 1 % SDS-Stammlösung | 1 g SDS in 100 ml DEPC Wasser |

| | |
|--|--|
| Solubilisierungspuffer | 0,1 M NaOH 1 % Na_2CO_3 1 % SDS |
| Stripping-Puffer | 62,5 mM Tris 2 % SDS pH 6,7 Aufbewahrung bei Raumtemperatur für Gebrauch auf 54 °C erwärmen frisch zusetzen: 100 mM 2-Mercaptoethanol |
| 50x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer | 2 M Tris 0,95 M Essigsäure 100% 0,1 M $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ für Gebrauch 1:50 verdünnen |
| 10x TN-Puffer (Tris-Natriumchlorid-Puffer) | 1,5 M NaCl 10 mM Tris für Gebrauchspuffer (TN-Puffer): 1:10 |
| Tris-HCl-Puffer, pH 6,8 | 1,25 M Tris pH 6,8 Aufbewahrung bei 4 °C |
| Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 | 1,875 M Tris pH 8,8 Aufbewahrung bei 4 °C |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 0,1 M Tris in DEPC-Wasser pH 8,0 |
| TN/T-Puffer | 0,1 % Tween®20 in TN-Gebrauchspuffer |
| Verdaupuffer für Mausschwanzbiopsien | 292,2 mg NaCl 5 ml 1 % SDS-Stammlösung 25 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 0,5 M EDTA mit DEPC-Wasser auf 45 ml auffüllen steril filtrieren bei Raumtemperatur lagern frisch zusetzen 16 µl Proteinase K (ca. 10 U) pro ml |
| Wasch-Lysepuffer | 50 mM Tris pH 7,4 2 mM EDTA 1 mM EGTA 50 mM NaF Aufbewahrung bei 4 °C frisch zusetzen: 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 1 mM Na_3VO_4 1 mM DTT |

2.1.8 Materialien und Geräte

Pipetten, Pipettenspitzen, 1,5 ml- und 2 ml-*tubes* und Handschuhe, also Materialien des täglichen Laborbedarfs, sind von den Firmen Eppendorf, Greiner Bio-One, Brand® und Mediatech®. In Tabelle 17 und Tabelle 18 sind weitere verwendete Materialien aufgelistet, in Tabelle 19 die verwendeten Geräte:

Tabelle 17: Materialien

| Material | Hersteller |
|---|--|
| BD Microlance™ 3 (22G) | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey |
| Cell scraper blue 25,0 cm | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Deckgläser, rund 12 mm (IF) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Deckgläser, selektiert 24x50 (IHC) | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| ECIS-Cultureware (W8E10) | ibidi GmbH, Martinsried |
| Falcon® Polystyrene Round Bottom Tube | Corning Inc., Durham, USA |
| Feather Microtome Blade R35 | pfm medical ag, Köln |
| Filterpapier Chrom-Paper Sheets | Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich |
| Fotofilm | Fujifilm Corporation, Tokio, Japan |
| Hamilton-Spritze | Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz |
| Immobilon™-P Transfer Membranen | Millipore Corporation, Billerica, USA |
| Sterican® 30 G x ½ " | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Küvetten | SARSTEDT AG & Co., Numbrecht |
| Minisart® (Sterilfilter) | Sartorius AG, Göttingen |
| Monoject™ Blunt Cannula (stumpfe Kanülen) | Covidien, Mansfield, MA USA |
| Nabelklemmen ratiomed | Plazotta Onlineshop. München |
| Parafilm | American Can Company, Greenwich |
| Polysine®-slides | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| Präparierbesteck | Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Precellys Keramik-Kit 1.4 mm (für Minilys) | Peglab VWR International GmbH, Erlangen |
| PS-Microplate, 96-well (Flat-bottom, half area) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Skalpell | P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln |
| Wattestäbchen | NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Ko KG, Wetter Int. Ltd. Maidstone England |
| P-81-Whatman-Phosphocellulose Filterpapier | Whatman International Ltd., Maidstone, England |
| TurbOflow™ Kassetten | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| SnapTwist Scintillation Vials | Simport, Beloeil, Kanada |
| Zellkulturgefäße cellstar® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

Tabelle 18: Slides für Leberparametermessung

| Name | Katalognr. | Parameter | Hersteller |
|--------------|------------|--|----------------------------------|
| GOT/AST-PII | 1511 | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase / Aspartat-Aminotransferase (AST) | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf |
| GPT/ALT-PIII | 1512 | Glutamat-Pyruvat-Transaminase / Alanin-Aminotransferase (ALT) | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf |
| LDH-PIII | 1514 | Laktat-Dehydrogenase (LDH) | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf |

Tabelle 19: Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| BD FACS Canto™ (Durchflusszytometer) | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey |
| Biofuge pimo R (Kühlzentrifuge) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Bio Rad Modell 200/2.0 Power Supply | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Bio Rad Power Pac 200 / 1000 (Stromversorgung) | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Bio Rad Trans Blot™ Cell | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Biostep Dark Hood DH-10 | biostep GmbH, Burkhardtsdorf |
| BP61 (Feinwaage) | Sartorius AG, Göttingen |
| BP310P (Oberschalenwaage) | Sartorius AG, Göttingen |
| DRÄGER Vapor 19.3 für Isofluran | Drägerwerk AG, Lübeck |
| EasyCast™ Horizontal System | Owl Scientific Inc., Woburn, MA, USA |
| ECIS Zθ | ibidi GmbH, Martinsried |
| Filterabzug mc6 | Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG |
| FUJIFILM Dry Chem 3500i | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf |
| Heracell 150 (Brutschrank) (37 °C, 5 % CO ₂) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Hoefer Mighty Small (Elektrophoreseapparatur) | Hoefer, Inc., Holliston, USA |
| KH-3 (Kühlung Blottingapparatur) | Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Kreisschüttler KS501 digital | IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Kühlschränke +4 °C / -20 °C | Liebherr-International Deutschland GmbH |
| Labofuge 400R | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Laminarbox Herasafe | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Leica TCS SP5 (Laser Scanning Mikroskop) | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Magnetrührer | R3T GmbH, Taufkirchen |
| Mastercycler® ep | Eppendorf AG, Hamburg |
| Masterflex® 900-292 (Perfusionspumpe) | Barnant Company, Barrington, IL, USA |
| MC1 Laboratory LC4200 (Waage) | Sartorius AG, Göttingen |
| Membranvakuumpumpe MP20/ System II | Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Microm EC 350 Modular tissue embedding center | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |

| | |
|---|---|
| Microm HM 335 E (Mikrotom) | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| Microprocessor ph-Meter pH537 | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim |
| Mikrowelle | Sharp Electronics GmbH, Hamburg |
| MINILYS Arbeitsplatz-Homogenisator | Peqlab VWR International GmbH, Erlangen |
| Nikon TMS-F Inversmikroskop | Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA |
| Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop | Olympus Corporation, Tokyo, Japan |
| Präziterm Typ PZ 35 | Störk-Tronic, Störk GmbH & Co KG, Stuttgart (Vaihingen) |
| Protean® II xi Cell | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Shandon™ Coverplate | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| Shandon™ Sequenza (Färbeapparatur IHC) | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| Spektrophotometer Uvikon 930 | tresser instruments, Groß-Zimmern |
| STP 120 Spin Tissue Processor (Histokinette) | Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich |
| Taumelschüttler WT17 | Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Tecan Sunrise | Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg |
| Thermostat Julabo | JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach |
| UV transilluminator crosslinker TFL-20M | Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Vortex | IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen |
| Wallac W1410 Liquid Scintillation Counter (LSC) | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| Wärmeinkubator Heraeus functionline | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Wärmeinkubator OV3 | Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Wasserbad M6 Lauda | MS Laborgeräte, Wiesloch |

2.2 Methoden *in vivo* – Tierversuche

Für die *in-vivo*-Experimente dieser Doktorarbeit wurde die Maus als Tiermodell gewählt. Die Mausezucht wurde in der Service Einheit Kleintiere im Forschungszentrum in Lobeda, Jena durchgeführt. Für Experimente wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 13 Wochen verwendet. KO-Mäuse wurden mit ihren WT-Zuchtgeschwistern verglichen. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse ins Institut für Molekulare Zellbiologie bestellt und zur Akklimatisierung im Tierschrank der Firma EHRET GmbH & Co. KG gehalten (12 Stunden hell/12 Stunden dunkel-Zyklus, 29 °C, >30 % Luftfeuchtigkeit). Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter (LASQCDiet® Rod16 Auto von LASvendi, Soest/Westf.) Weibliche Mäuse wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn synchronisiert, um ein vergleichbares hormonelles Stadium zu erreichen [112,113]. Dazu wurde Streu aus Käfigen, in welchen männliche Mäuse gehalten wurden, in die Käfige der Weibchen gegeben.

2.2.1 Genotypisierung von Mäusen

Die Zucht der für die Arbeit verwendeten Mäuse wurde durch Verpaarung heterozygoter Mäuse vollzogen. Deshalb mussten die Neugeborenen für die späteren Versuche anhand einer Schwanzbiopsie, wie im Folgenden beschrieben, genotypisiert werden.

2.2.1.1 DNA-Isolation aus Mausschwanzbiopsien

Zunächst wurden die Mausschwanzbiopsien mit 300 µl Verdaupuffer versetzt und mindestens 3 Stunden bei 55 °C und 500 rpm im Thermoblock inkubiert. Nach Auflösung des Gewebes wurden Zelltrümmer und Gewebekomponenten für 10 Minuten bei 15000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Hütchen überführt und zur Fällung der DNA mit demselben Volumen an 100 % Isopropanol versetzt. Die ausgefallene DNA wurde dann für 20 Minuten bei 15000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals 10 Minuten bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das entstandene Pellet wurde bei maximal 42 °C getrocknet, anschließend in 40 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 500 rpm und 60 °C im Thermoblock geschüttelt. Die gelöste DNA wurde bei 4 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Genomische DNA sollte weder eingefroren noch gevortext werden, da sie durch diese Behandlungen zerstört wird.

2.2.1.2 Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierungs-PCR wurde in dieser Arbeit mit dem Dream Taq Green PCR Master Mix von Fermentas durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden für beide Mausstämme getrennt als WT- und Transgen-Ansatz entsprechend der Tabelle 20 auf Eis pipettiert. Die DNA wurde im letzten Schritt zugesetzt und die PCR im Eppendorf-Cycler entsprechend Tabelle 21 durchgeführt.

Tabelle 20: Ansätze für Genotypisierungs-PCR

| Ansatz | $\alpha 1$ Wildtyp | $\alpha 1$ Transgen |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Dream Taq MM | 6 μ l | 6 μ l |
| Forward Primer | 0,26 μ l α WT F | 0,26 μ l IRES Fa2 |
| Reverse Primer | 0,26 μ l α WT R | 0,26 μ l 3.0 Ra1 |
| DEPC-Wasser | Ad 11 μ l | Ad 11 μ l |
| Mischen und vorlegen | | |
| DNA | 1 μ l | 1 μ l |

Tabelle 21: PCR-Programm für Genotypisierung

| Ansatz | $\alpha 1$ | | |
|----------------------|------------|-------|-----------|
| Denaturierung | 5 min | 94 °C | |
| Denaturierung | 30 s | 94 °C | |
| Primerhybridisierung | 30 s | 56 °C | 40 Zyklen |
| Elongation | 1 min | 72 °C | |
| Elongation | 5 min | 72 °C | |

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die nach der PCR erhaltenen Ansätze wurden im Agarose-Gel aufgetrennt. Dafür wurde ein 1,5 %iges Agarosegel in TAE-Puffer – versetzt mit Red Safe für das Sichtbarmachen der DNA – gegossen. Die PCR-Ansätze und ein DNA-Marker wurden in die Taschen aufgetragen und 1 Stunde bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit UV-Licht beleuchtet und fotografiert und die Banden wurden anhand ihrer Lokalisation im Gel den Basenpaaren entsprechender Größe zugeordnet. Die PCR-Produkte für die Genotypisierung von AMPK $\alpha 1$ -KO-Mäuse sind 450 bp (WT) beziehungsweise 350 bp (Transgen) groß. War sowohl im WT als auch im Transgen-PCR-Ansatz ein Signal detektierbar, war die Maus heterozygot, ansonsten wurde die Maus dem Genotyp mit dem jeweils detektierbaren Signal zugeordnet.

2.2.2 Auslösung einer systemischen Inflamationsantwort durch LPS-Injektion

Als Modell für eine systemische Inflammation in Mäusen wurde in diesem Projekt die Auslösung einer subletalen Endotoxämie durch LPS gewählt. Dazu wurde der Maus unter Isoflurannarkose (2,5-3 % Isofluran) intraperitoneal 10 µg/g Körpergewicht (KG) LPS injiziert [114,115]. Hierfür wurde eine Lösung mit der Konzentration 1 µg/µl LPS in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verwendet. Kontrollmäuse erhielten eine Injektion von 10 µl/g KG einer 0,9 %igen NaCl-Lösung.

2.2.3 *In-vivo*-Permeabilitätsassay mit Evans Blue (*Organ Leakage Assay*)

Der *Organ Leakage Assay* wurde durchgeführt, um die Barriestörung der Gefäße in den Organen bei einer systemischen Entzündung zu untersuchen. *Evans Blue* bindet im Blut an Albumin, welches unter Normalbedingungen nicht ins Gewebe eintritt. Erst bei Permeabilitätserrhöhung der Gefäße kommt es zum Austritt von Albumin aus dem Blut und zur Ansammlung im Gewebe. Der an das Albumin gebundene Farbstoff sammelt sich somit ebenfalls in den Organen an und dient als Indikator für die Gefäßdurchlässigkeit. Beim *Organ Leakage Assay* wurden endotoxämische Mäuse mit gesunden Mäusen verglichen, wobei jeweils KO-Mäuse und WT-Mäuse mit demselben genetischen Hintergrund eingesetzt wurden.

Zu Beginn des Experiments wurde den Mäusen LPS oder das entsprechende Vehikel injiziert (siehe 2.2.2). Eine Stunde vor Ende des Experiments erfolgte unter Isoflurannarkose die Injektion von etwa 100 µl einer 0,5 %igen *Evans Blue*-Lösung (in PBS) in die Schwanzvene. Zum Versuchsende (6 beziehungsweise 12 Stunden nach LPS-Injektion) wurde die Maus erneut mit 2,5-3 % Isofluran betäubt, und mit Hilfe von Klebeband an Vorder- und Hinterbeinen auf der Operations-Unterlage fixiert. Die Bauchdecke wurde bis zu den Rippen geöffnet. Anschließend wurden Muskel- und Hautschicht nach oben geklappt und das Sternum mit einer Klemme fixiert, so dass das Zwerchfell gestreckt war. Nach Öffnung des Zwerchfells und der Rippenbögen wurde das Herz mit einer Pinzette fixiert, um mit einer heparinisierten Spritze aus der Herzspitze Blut entnehmen zu können. Dieses wurde in ein Eppendorfhütchen überführt. Herz, rechter und linker Lungenflügel sowie die Leber und beide Nieren wurden dann entnommen und in einem Petrischälchen mit 0,9 % NaCl gewaschen. Das sich noch im Herzen befindende Blut wurde durch leichtes Ausdrücken mit einer Pinzette entfernt. Nach dem Waschen wurden die Organe mit Papiertüchern vorsichtig getrocknet. Zur Überprüfung von Ödembildung wurde das Nassgewicht bestimmt. Die Organe wurden in Eppendorfhütchen überführt und eingeschnitten. Bei den Nieren wurden zuvor die Nierenkapseln entfernt, von der Leber wurde nur ein Teil verwendet. Zu allen Organen wurden 300 µl Formamid gegeben, zu der

Leber 600 µl. Die Extraktion von *Evans Blue* erfolgte 3 Tage lang unter leichtem Schütteln bei 55 °C im Thermoblock. Aus dem entnommenen Blut wurde durch 10-minütige Zentrifugierung bei 2000 x g und 4 °C Plasma gewonnen. 75 µl des Plasmas wurden mit 150 µl Formamid versetzt, um ebenfalls *Evans Blue* zu extrahieren. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Extrakte der Organe sowie die Plasmaprobe 5 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und 2 x 75 µl vom Überstand in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 610 nm, 450 nm und 740 nm. Als Standard diente eine *Evans Blue*-Verdünnung in PBS sowie eine pure PBS-Probe als Leerwert. Bei 610 nm wurde der *Evans Blue*-Gehalt und bei 450 nm der Hämoglobingehalt der Proben ermittelt; bei 740 nm wurde die Überlappung von *Evans Blue* und Hämoglobin gemessen. Anhand der Formel von Moitra et al. [116] erfolgte die Berechnung des *Evans Blue*-Gehalts in den Proben und die Korrektur auf den Hämoglobingehalt und den Plasma-*Evans Blue*-Gehalt. Zusätzlich wurden die Werte auf das Trockengewicht der Organe bezogen. Dazu werden die Organe zweimal mit PBS für mehrere Stunden unter leichtem Schütteln bei 55 °C gewaschen, danach einen Tag bei 90 °C getrocknet und anschließend gewogen.

2.2.3.1 Organ Leakage Assay mit AICAR

Für den *Organ Leakage Assay* mit AICAR wurden ausschließlich WT-Mäuse verwendet. 4 Stunden vor LPS-Injektion wurde den Mäusen unter Isoflurannarkose AICAR in einer Konzentration von 500 µg/g KG (12,5 µl/g KG einer Stammlösung von 40 mg/ml in 0,9 % NaCl) intraperitoneal injiziert. Kontrollmäuse erhielten eine Injektion von 12,5 µl/g KG des Vehikels. 4 Stunden nach AICAR-Injektion erfolgte eine LPS-Injektion und die Weiterführung des Versuchs nach 2.2.3. Die *Evans Blue*-Injektion erfolgte dabei 11 Stunden und die Organentnahme 12 Stunden nach LPS-Injektion.

2.2.4 Überlebensstudie

2.2.4.1 Dosisstudie

Vor der Überlebensstudie wurde eine Pilotstudie durchgeführt, um die LPS-Dosis zu finden, die den WT-Mäusen injiziert werden muss, damit 50 % der Mäuse sterben. Nur so kann bei einer Überlebensstudie eine Aussage über eine erhöhte oder verminderte Sterblichkeit der genetisch veränderten Mäuse getroffen werden. Zu Beginn der Studie wurde den Mäusen intraperitoneal LPS in verschiedenen Dosen injiziert. Zusätzlich wurde 0,9 % NaCl als Volumenausgleich injiziert, so dass das injizierte Gesamtvolumen 500 µl betrug. Die Mäuse wurden maximal zu zweit im Käfig gehalten und mit nassem, auf dem Käfigboden stehendem Futter versorgt. Nach der Injektion wurden die Mäuse alle 6 Stunden beurteilt,

um den klinischen Score aufzunehmen. Verstorbene Mäuse wurden aus den Käfigen entnommen und gewogen. Nach 132 Stunden wurde der Versuch beendet und anhand einer Kaplan-Meier-Kurve ausgewertet.

2.2.4.2 Überlebensstudie

Den Mäusen wurde intraperitoneal die bei der Pilotstudie ermittelte LPS-Dosis, die zu 50 % Sterblichkeit geführt hatte, injiziert (20 µg/g KG). Mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung wurde das injizierte Gesamtvolumen auf 500 µl aufgefüllt. Die Versorgung und Beobachtung der Mäuse sowie die Auswertung von klinischer Symptomatik und Sterblichkeit erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

2.2.5 IHC

2.2.5.1 Blutentnahme und Perfusion von Mäusen für IHC

Um zu untersuchen, wie sich LPS-Injektion auf Parameter in Blut und Organen auswirkt, erfolgte Blutentnahme, Perfusion der Organe sowie *in-situ*-Fixierung der Gewebe mit nachfolgendem Herstellen von Gewebeschnitten. Den Mäusen wurde unter Isoflurannarkose intraperitoneal 10 µg/g KG LPS injiziert. 6 Stunden später erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100 µl Heparin-Natrium (entsprechend 500 I.E.) und nach weiteren 5 Minuten die Eröffnung des Bauchraums und die Blutentnahme aus der linken Herzkammer mit einer heparinisierten Spritze. In die bei der Blutentnahme durch die Kanüle entstandene Öffnung wurde anschließend eine Rundkanüle eingeführt, welche mit einer Pumpe verbunden war. Es wurde so mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min eiskaltes PBS in das Herz transportiert und durch die noch vorhandene Schlagleistung des Herzen in den Körper gepumpt. Der rechte Vorhof des Herzen wurde eröffnet, so dass das bei diesem Prozess aus dem Körper gespülte Blut ablaufen konnte. Nach 10 Minuten wurde die PBS-Lösung zur Fixierung der Körpergewebe durch eiskaltes 4 %iges-PFA ersetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurden Organe entnommen und in eiskalte 4 %ige PFA-Lösung überführt, wo sie über Nacht weiter fixiert wurden.

2.2.5.2 Einbetten von Organen in Paraffin und Herstellen von Paraffinschnitten

Die über Nacht in 4 % PFA fixierte Leber wurde aus der Fixierlösung genommen und geschnitten. Bei allen entnommenen Lebern wurde nach dem gleichen Prinzip ein Stück vom großen Leberlappen und ein Stück von zwei zusammenhängenden kleinen Leberlappen herausgeschnitten (Abbildung 10) und in eine Plastikkassette gelegt. Die Organstücke wurden für etwa 1,5 Stunden mit Leitungswasser gewässert, bevor sie in einer Histokinette durch Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 99 % Ethanol) entwässert wurden. Im Anschluss daran wurde das Gewebe mit Ethanol und Xylol im Verhältnis 2:1, dann im Verhältnis 1:2 inkubiert und letztendlich noch mit purem Xylol

behandelt. Danach erfolgte ein erster Inkubationsschritt in Paraffin, bei welchem sämtliche Poren im Gewebe mit Paraffin gefüllt wurden. Nach Ablauf des Histokinette-Programms wurden die paraffinierten Organstücke in Paraffin eingebettet. Aus dem ausgehärteten Paraffinblock wurden im Mikrotom 6 µm dicke Organschnitte angefertigt, welche auf Polylysin-beschichtete Objektträger überführt wurden. Nach Antrocknen der Schnitte auf den Objektträgern wurden sie für immunhistochemische Untersuchungen eingesetzt.

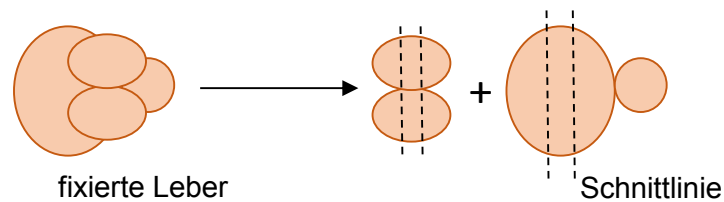


Abbildung 10: Schneiden der Leber für Paraffineinbettung. Zwei kleine Leberlappen werden zusammenhängend vom großen Leberlappen getrennt. Entlang der dargestellten Schnittlinien wird aus beiden Stücken ein Teil zur Einbettung in Paraffin herausgeschnitten.

2.2.5.3 Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten

Zur Vorbereitung sämtlicher Gewebefärbungen mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte dreimal für 15 Minuten in Xylol inkubiert. Es folgte die Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe zur Rehydrierung des Gewebes. Das bedeutet, dass die Schnitte für je 5 Minuten in Ethanollösungen der Konzentration 99 %, 96 %, 70 % und 50 % inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine Waschung für 5 Minuten in ddH₂O.

2.2.5.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung wird angefertigt, um eine Übersicht über die Struktur des Gewebes zu bekommen. Dabei färbt Hämatoxylin die Zellkerne und Eosin das Zellplasma. Zur Färbung wurden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte (2.2.5.3) für 20 Minuten in einer gefilterten Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Danach wurden sie mit ddH₂O abgespült, bevor sie in einem Wässerungsschritt unter laufendem lauwarmem Leitungswasser durch Erhöhung des pH-Wertes gebläut wurden. Anschließend wurden die Schnitte in ddH₂O überführt. Es folgte ein Färbeschritt in filtrierter alkoholischer Eosin-Lösung für 10 Sekunden, woraufhin die Schnitte mit ddH₂O gewaschen wurden, bis die Lösung wieder farblos war. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 99 %) und anschließender Inkubation in Xylol wurden die Schnitte wieder

dehydriert und anschließend mit Neo-Mount eingebettet. Die Auswertung erfolgte nach Trocknen der Präparate unter dem Lichtmikroskop.

2.2.5.5 IHC mit Fluoreszenzmarkierungen

Um Gewebeschnitte auf Gehalt und Lokalisierung bestimmter Proteine hin zu untersuchen, können sie mit spezifischen Antikörpern angefärbt werden. Da in der vorliegenden Studie mit formalinfixierten Paraffinschnitten gearbeitet wurde, in denen durch Vernetzung verschiedener Proteine die Zugänglichkeit der Antikörper zu bestimmten Epitopen behindert wird, muss vor der beabsichtigten Immunreaktion eine Antigen-Demaskierung durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die Methode des Hitze-induzierten *Antigen Retrieval* mit Citratpuffer gewählt. Dazu wurden die entparaffinierten, rehydrierten Gewebeschnitte in Citratpuffer überführt und für 11 Minuten bei 900 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur wurden sie zweimal 8 Minuten mit PBS und zweimal 5 Minuten mit PBS/T gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 37 °C in der Färbeapparatur blockiert. Das zur Blockierung verwendete Serum stammte dabei aus dem Tier, aus dem auch der später verwendete Sekundärantikörper gewonnen wurde. Auf den Blockierungsschritt folgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBS/T. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper (Tabelle 9) inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal 5 Minuten mit PBS/T gewaschen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 1:400 verdünntem Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper (Tabelle 10) in Blockierungslösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS/T wurden die Schnitte eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 1:400 verdünntem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Streptavidin (Tabelle 10) in Blockierungslösung inkubiert. Es folgten nochmals drei Waschschrte mit PBS/T und danach drei 5-minütige Waschschrte mit PBS, bevor die gefärbten Schnitte mit Fluoromount eingebettet wurden. Für eine PMN-Färbung war der Verstärkerschritt mit Biotin-Streptavidin nicht notwendig und auf die Primärantikörper-Inkubation folgte die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Sekundärantikörper (Tabelle 10). Die gefärbten Schnitte wurden im Dunkeln im Kühlschrank gelagert; die Auswertung erfolgte je nach Färbung am Fluoreszenz- oder am Laser Scanning Mikroskop.

2.2.6 Leberentnahme für Western Blot und Zytokinmessung

Die Leberentnahme erfolgte 6 Stunden nach intraperitonealer Injektion von LPS (10 µg/g KG) oder Vehikel (10 µl/g KG 0,9 % NaCl). Gleichzeitig wurde mit einer heparinisierten Spritze Blut aus der linken Herzkammer entnommen. Die Leber wurde kurz in 0,9 % NaCl gewaschen, abgetrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.6.1 Herstellen von Leberlysaten für Western Blot

Ein etwa 100 mg schweres Leberstück wurde in gefrorenem Zustand in ein mit Keramikbeads gefülltes Reaktionsgefäß überführt und mit dem 10-fachen Volumen an Lysepuffer für Leberlysate (Western Blot) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde in eine Minilys-Apparatur eingespannt und das Gewebe für 25 Sekunden bei 5000 rpm zerkleinert. Das Homogenat wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert, bis sich der entstandene Schaum auflöste. Von allen hergestellten Homogenaten wurde die gleiche Menge Überstand in ein neues Eppendorf-Hütchen überführt. Die Hütchen wurden für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert und dabei drei- bis viermal gevortext. Es folgte ein 6-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3000 x g und 4 °C. Der entstandene Überstand wurde mit einer 20 G-Kanüle abgenommen, so dass weder das Pellet noch der entstandene Fettrand mit aufgenommen wurden, und in ein neues Eppendorf-Hütchen überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde nach Lowry (2.3.3) bestimmt. Anschließend wurden für jede Probe 500 µl eines mit dreifach konzentrierten Lämmli-Probenpuffer versetzten Lysats mit der Endkonzentration von 2 µg/µl hergestellt. Dieses wurde bei -20 °C bis zur elektrophoretischen Auftrennung gelagert. Das übrige Lysat wurde aliquotisiert und bei -80 °C für weitere Verwendung gelagert.

2.2.6.2 Herstellen von Leberlysaten für Zytokinmessung

Ein etwa 100 mg schweres Leberstück wurde in gefrorenem Zustand in ein mit Keramikbeads gefülltes Reaktionsgefäß überführt und mit dem fünffachen Volumen an Lysepuffer für Leberlysate (Zytokinmessung) versetzt. Anschließend wurde Gewebe wie in 2.2.6.1 beschrieben in einer Minilys-Apparatur homogenisiert. Das Homogenat wurde eine Stunde lang bei 4 °C über Kopf gemischt und anschließend 15 Minuten bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Entnahme des entstandenen Überstands und die Überführung in ein neues Eppendorf-Hütchen erfolgte mit Hilfe einer 20 G-Kanüle. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde nach Lowry (2.3.3) bestimmt. Das Lysat wurde in Aliquots bei -80 °C bis zur Zytokinmessung (2.2.9) gelagert.

2.2.7 Gewinnung von Plasma für Messung verschiedener Plasmaparameter

Das in den einzelnen Experimenten (2.2.3, 2.2.5.1, 2.2.6) entnommenen Blut wurde sofort in ein Eppendorfhütchen auf Eis überführt und anschließend 10 Minuten bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein neues Eppendorfhütchen transferiert und nochmals

zentrifugiert. Das so gewonnene reine Plasma wurde aliquotisiert und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.8 Messung von Leberfunktionsparametern

Die bei den Tierversuchen gewonnenen Plasmaproben (2.2.7) wurden mit Hilfe des Fujifilm Dry Chem 3500i Analysegeräts auf Leberfunktionsparameter hin untersucht. Vor der Messung erfolgten die Kalibrierung des Gerätes mit der jeder Slide-Packung beiliegenden QC-Karte und die Einstellung von eventuellen Verdünnungen und gewünschten Einheiten. Die verwendeten *Slides* (Tabelle 18) wurden im Gerät gestapelt und die auf Eis aufgetaute Probe wurde in die Halterung gegeben. Das Gerät pipettierte nun 10 µl-Portionen auf die jeweiligen *Slides*, welche anhand einer kolorimetrischen Reaktion Auskunft über die Höhe der zu messenden Parameter gaben. Eventuelle Verdünnungen wurden mit 0,9 % NaCl hergestellt.

2.2.9 Zytokinmessung mittels BD™ Cytometric Bead Array (CBA)

Sowohl in den bei verschiedenen Tierversuchen gewonnenen Plasmaproben (2.2.7) als auch in Leberlysaten (2.2.6.2) wurde der Zytokingehalt mit dem BD™ CBA, einem *Bead*-basierten Immunoassay, bestimmt. Dieser Assay erlaubt bei Einsatz von wenig Probenmaterial die Analyse mehrerer Parameter gleichzeitig.

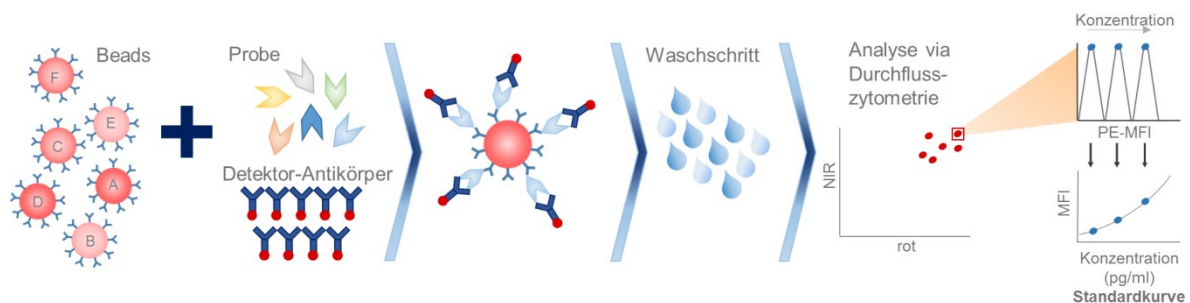


Abbildung 11: Prinzip der Zytokinmessung mittels BD™ Cytometric Bead Array CBA. Die Probe wird mit beschichteten Beads und PE-markierten Detektor-Antikörpern inkubiert und nach einem Waschschritt im Durchflusszytometer analysiert. Anhand einer mitgeführten Standardkurve kann die in der Probe enthaltene Zytokinkonzentration ermittelt werden (verändert nach BD™).

Wie in Abbildung 11 gezeigt werden verschiedene *Beads* in einem Ansatz verwendet, die mit Antikörpern beschichtet sind, an welche die Analyten binden können. In der vorliegenden Studie wurden die *Beads* mit den Antikörpern gegen Interferon-γ (IFN-γ), IL-1β, IL-10, IL-6, MCP-1 und TNF (Tabelle 11) zunächst gepoolt und 16,7 µl dieser Mischung in ein Reaktions-Tube vorgelegt. Des Weiteren wurden 16,7 µl Probe und 16,7 µl PE-

Detektionsreagenz zugegeben. Letzteres enthält Antikörper, welche wiederum an das Reportermolekül PE gebunden sind. Nach 2-stündiger Inkubation der Ansätze im Dunkeln folgte ein Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer und anschließender Zentrifugierung (200 x g, 5 Minuten). Nach Verwerfung des Überstands wurde das Pellet in 300 µl Waschpuffer aufgenommen. Die Analyse fand im Durchflusszytometer statt, wobei die Software für alle individuellen Beads jeweils ein Gate setzt und sie damit als eine Population definiert. Für jeden Analyten wird die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt und anhand einer mitgeführten Standardkurve die Konzentration berechnet.

2.3 Methoden *in vitro*

2.3.1 Zellkultur

In allen *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit wurden primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene verwendet (HUVEC). Primäre Zellen gelten als gutes Modell, da sie bezüglich Morphologie, Wachstum, Proliferation, Adhärenz und Migrationsverhalten die *in-vivo*-Situation im menschlichen Körper widerspiegeln und nicht wie Zelllinien durch Immortalisierung veränderte Eigenschaften aufweisen.

2.3.1.1 Präparation von HUVEC

Nach Reinigung und Desinfektion der Nabelschnur mit 70 % Ethanol wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminarbox mit einem Skalpell beide Enden der Schnur abgeschnitten. In beide Enden der *Vena umbilicalis* wurden zum Einbringen von Lösungen stumpfe Kanülen eingeführt und mit Nabelklemmen fixiert. Die Vene wurde anschließend mit Penicillin/Streptomycin-haltiger 0,9 % NaCl gespült und danach 3 Minuten mit 0,01 %-iger Kollagenaselösung bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurde die Nabelschnur zur Unterstützung des Ablösens der Endothelzellen leicht massiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kollagenaselösung mit den abgelösten Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Vene wurde mit Penicillin/Streptomycin-haltigem Stoppmedium gespült und die Lösung anschließend mit der aufgefangenen Kollagenaselösung vereint. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 6 Minuten bei 500 x g. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde in 1 ml Stoppmedium aufgenommen und resuspendiert. Die Aussaat der Zellsuspension erfolgte in T75-Zellkulturflaschen, die zuvor mit 0,2 % Gelatine beschichtet und mit 12-15 ml Stoppmedium versetzt worden waren. Zellen und Medium wurden sorgfältig gemischt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht-adhärenzte Zellen wurden nach 8 bis 24 Stunden durch Waschen des entstandenen Zellrasens mit PBS-Puffer entfernt. Die adhärenzten Endothelzellen wurden dann mit 12-15 ml Wachstumsmedium plus Ciprofloxacin versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum

Erreichen der Konfluenz nach etwa 5 Tagen kultiviert (ca. 5 Millionen Endothelzellen pro T75-Zellkulturflasche). Alle 2 Tage erfolgte dabei ein Halbmediumwechsel.

2.3.1.2 Kultivierung und Aussaat von HUVEC

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, Zellen der 2. Passage verwendet (10 – 14 Tage nach Präparation). Nach Kultivierung bis zur Konfluenz wurden HUVEC in der Regel im Verhältnis von 1:3, bei langsamem Zellwachstum aber auch 1:2 gesplittet. Dazu wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für maximal 3 Minuten mit 1,4 ml steriler Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) unter mikroskopischer Kontrolle bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Stoppmedium überführt. Nach Spülen der Zellkulturflasche mit Stoppmedium und Vereinigung des Mediums mit der Zellsuspension erfolgte eine Zentrifugierung für 6 Minuten bei 500 x g. Das entstandene Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und auf drei T75-Zellkulturflaschen verteilt, die mit 0,2 % Gelatinebeschichtet worden waren und 12 ml Wachstumsmedium plus Ciprofloxacin enthielten. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie mit 2-tägigem Halbmediumwechsel kultiviert. Danach erfolgten das Ablösen und die Aussaat für die jeweiligen Experimente. Hierzu wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Entsprechend Tabelle 22 wurden die Zellen auf Gelatine-beschichtete Zellkulturgefäße in Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass die ausgesäten Zellen nach 3 Tagen Konfluenz erreichen konnten. Die Aussaat der Zellen, die mit siRNA transfiziert werden sollten (2.3.1.3), erfolgte in einer niedrigeren Dichte, so dass am Tag nach Aussaat 50-60 % Konfluenz erreicht wurde. Zellen für Studien von *tight junction*-Proteinen wurden mit Wachstumsmedium mit dreifach konzentriertem Mitogen kultiviert.

Tabelle 22: Zellzahlen für die Aussaat auf verschiedene Zellkulturgefäße

| Zellkulturgefäß | Medium [ml] | Eingesetzte Zellzahl |
|-----------------|-------------|-----------------------|
| T 75-Flasche | 12-15 | 1.000.000 – 2.000.000 |
| 90 mm Schale | 7 | 1.000.000 |
| 30 mm Schale | 2 | 180.000 |
| 24-Well-Platte | 0,5 | 70.000 |

2.3.1.3 Transfektion von HUVEC

In einigen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden HUVEC verwendet, in welchen die katalytische α -Untereinheit der AMPK mittels siRNA herunterreguliert wurde. Bei

siRNA handelt es sich um kurze etwa 20 bp lange doppelsträngige Nukleotide, welche in eukaryotischen Zellen per RNA-Interferenz (RNAi) auf posttranskriptionaler Ebene die Hemmung der Genexpression bewirken. Um in diesen Versuchen sicher zu gehen, dass der beobachtete Effekt auf dem Fehlen des herunterregulierten Enzyms basiert, wurden zur Kontrolle Zellen verwendet, welche mit Kontroll-siRNA, also siRNA mit keiner dem Humangenom entsprechenden Sequenz, transfiziert wurden. In dieser Arbeit wurden HUVEC per Lipofektion mit dem Reagenz SAINT-RED transfiziert. Die zwei darin enthaltenen amphiphilen Lipide N-methyl-4-(diolel)methylpyridinimchlorid (SAINT-18) und Diolelphosphatidylethanolamin (DOPE) bilden zusammen mit der siRNA Lipoplexe aus, welche von HUVEC über Endozytose aufgenommen werden. Im Allgemeinen wurden nach 2.3.1.2 ausgesäte Zellen am Tag nach der Aussaat transfiziert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit warmem HBSS gewaschen und anschließend nach Standardprotokoll von Synvolux Therapeutics B.V. wie in Abbildung 12 gezeigt transfiziert.

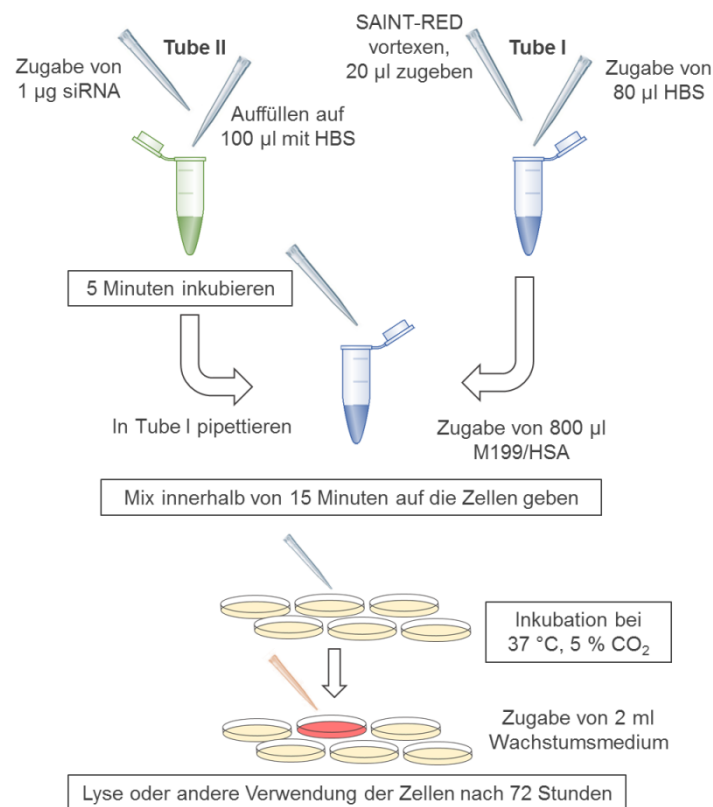


Abbildung 12: Transfektionsprotokoll für SAINT-RED. Die Abbildung zeigt das Standard-Transfektionsschema für eine 30-mm-Zellkulturschale oder 6-Well-Platte. Werden größere oder kleinere Zellkulturgefäße verwendet, so müssen die angegebenen Mengen entsprechend der Fläche des Zellkulturgefäßes vervielfacht oder reduziert werden (verändert nach SYNVOLUX THERAPEUTICS B.V.).

2.3.2 Herstellung von Endothelzelllysaten für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

In den *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit wurde die Wirkung proinflammatorischer Stimuli auf Signalwege in HUVEC sowie deren Einfluss auf AMPK-Aktivität und die Wechselwirkung mit AMPK hin untersucht. Die Konzentration der dabei eingesetzten Substanzen ist Tabelle 23 zu entnehmen. Die Zellen wurden zunächst stimuliert und anschließend lysiert. Stimulierungen bis zu 4 Stunden wurden nach 1 Stunde Vorinkubation im serumfreien Medium im gleichen Medium durchgeführt. Stimulierungen bis zu 24 Stunden wurden im serumarmen Wachstumsmedium ohne Vorinkubation durchgeführt. Alle Inkubationen erfolgten bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tabelle 23: Konzentration der bei den Versuchen eingesetzten Substanzen

| Substanz | Eingesetzte Konzentration |
|------------|--|
| A769662 | 200 µM |
| AICAR | 2 mM (Kurzzeitstimulierung) 0,5 mM (Langzeitstimulierung) |
| IL-1β | 100 ng/ml |
| LPS | 1 µg/ml |
| TNF-α | 100 ng/ml |
| VEGF | 50 ng/ml |
| Zytokinmix | 50 ng/ml IL-1β + 50 ng/ml TNF-α + 1 µg/ ml LPS |

Nach Ablauf der Stimulationszeiten wurden die Zellen auf Eis gestellt, zweimal mit Wasch-Lysepuffer gewaschen, anschließend gleichmäßig mit Lysepuffer plus Proteinaseinhibitoren bedeckt und 15 Minuten inkubiert. Für eine 30-mm-Zellkulturschale wurden 60 µl Lysepuffer eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig – so dass die Zellkerne weitgehend intakt blieben – mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Hütchen überführt. Nach einem Zentrifugierungsschritt für 6 Minuten bei 700 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Hütchen überführt. Aus diesem Überstand erfolgte die Entnahme von 2 x 2 µl für die Proteinbestimmung nach Lowry (2.3.3). Das restliche Lysat wurde gewogen, im Verhältnis 1:3 mit dreifach konzentrierten Lämmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C unter leichtem Schütteln gekocht. Danach erfolgte die Lagerung bei -20 °C bis zur Analyse im SDS-Polyacrylamid-Gel.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinbestimmung wurde in dieser Arbeit die Methode von Lowry et al. (1951) gewählt, da die in zwei Schritten ablaufende Farbreaktion nicht durch das im Lysepuffer enthaltene SDS gestört wird. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} durch Komplexbildung mit den Peptidbindungen zu Cu^+ reduziert wird, sowie einer nachfolgenden Molybdänblau-Reaktion. Hierbei reagiert Cu^+ mit Tyrosin-, Tryptophan-, Cystein- sowie Histidinresten und gelbem Folinreagenz zu Molybdänblau. Die Intensität der Färbung ist dabei proportional zum Proteingehalt der Probe. In dieser Arbeit wurde zur Proteinbestimmung der Bio-Rad Dc Protein Assay von Bio-Rad-Laboratories Inc. verwendet. Dazu wurden die bei der Herstellung von Proteinlysaten abgenommenen 2 μl Probe mit ddH_2O verdünnt und entsprechend der Angabe des Herstellers mit den im Kit enthaltenen Reagenzien versetzt. Die Extinktion bei 750 nm Wellenlänge wurde anschließend im Photometer (Spektrophotometer Uvicon 930) gemessen. Zur Errechnung der Proteinkonzentrationen wurde eine Standardkurve mitgeführt. Die Standardproben enthielten 2 μl Lysepuffer mit Proteininhibitoren und eine definierte BSA-Menge (0, 2, 5, 10 und 20 μg BSA). Der durch die 0 μg -Probe ermittelte Leerwert wurde von allen Proben abgezogen.

2.3.4 Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE

Zur Analyse der hergestellten Lysate wurden diese elektrophoretisch über SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Voraussetzung dafür ist, dass alle Proteine durch Anlagerung von SDS die für die Auftrennung nötige negative Ladung erhalten. In dieser Arbeit wurden in der Regel 7,5 %ige Trenngele und für die Auftrennung kleiner Proteine 15 %ige Gele verwendet (Tabelle 24).

Tabelle 24: Pipettierschema für Polyacrylamidgele

| Reagenz | Volumen [ml] 7,5 % Trenngel | Volumen [ml] 15 % Trenngel | Reagenz | Volumen [ml] 5 % Sammelgel |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| ddH_2O | 16,0 | 8,6 | ddH_2O | 10,8 |
| Tris-HCl Puffer pH 8,8 | 6,0 | 6,0 | Tris-HCl Puffer pH 6,8 | 1,5 |
| Acrylamid | 7,6 | 15,0 | Acrylamid | 2,4 |
| 10 % SDS | 0,3 | 0,3 | 10 % SDS | 0,15 |
| 10 % APS | 0,1 | 0,1 | 10 % APS | 0,05 |
| 3 Minuten entgasen | | | 3 Minuten entgasen | |
| TEMED | 0,015 | 0,015 | TEMED | 0,015 |

Generell wurden von HUVEC-Lysaten 50 μg , von Leberlysaten 100 μg Protein aufgetragen. Für den Nachweis von Claudin-5 wurden entsprechend 20 μg beziehungsweise 40 μg

Protein eingesetzt. Die Proteine wurden unter Kühlung bei 90 mA für etwa 2 Stunden aufgetrennt. Die Zeit wurde je nach gewünschter Auftrennschärfe verlängert oder verkürzt.

2.3.5 Western Blotting

Beim Western Blot werden die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrochemisch auf eine mit Methanol aktivierte Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) übertragen. Sie werden durch Auswaschung des SDS renaturiert und können dann über spezifische Antikörper detektiert werden. In dieser Arbeit wurde die Methode des Tank-Blottings verwendet. Dazu wurde ein sogenanntes „Blotting-Sandwich“ aus drei Filterpapieren, dem Gel, der Membran und drei weiteren Filterpapieren zusammengebaut, zwischen zwei Faserplatten in die Blottingkassette gelegt und in den Tank eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgte unter Kühlung bei einer Stromstärke von 1,5 A. Wurden 7,5 %ige Gele verwendet, dauerte der Transfer 100 Minuten, bei 15 %igen Gelen 60 Minuten. Anschließend wurde die Membran aus dem Sandwich genommen, bei Bedarf für das Anfärben von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts geschnitten und 5 Minuten in TN-Puffer gewaschen. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden dann 1 Stunde lang in 5 % Milch in TN/T-Puffer blockiert, worauf drei 5-minütige Waschschriffe mit TN/T-Puffer folgten. Anschließend war die Membran bereit für das Anfärben mit dem Primärantikörper oder konnte für spätere Färbungen bei -20 °C gelagert werden.

2.3.6 Immundetektion von Proteinen

Zur Detektion von Proteinen wurde die wie in 2.3.5 beschriebene vorbereitete PVDF-Membran über Nacht bei 4 °C mit einer Primärantikörperlösung (Tabelle 3) inkubiert und anschließend viermal insgesamt 20 Minuten lang mit TN/T-Puffer gewaschen. Der anschließend zugegebene Sekundärantikörper (Tabelle 4) erkennt in der Regel die Fc-Bereiche des Primärantikörpers und ist an *horseradish-peroxidase* (HRP) gekoppelt, mit deren Hilfe die Proteine später durch *Enhanced Chemoluminescence* (ECL)-Technik sichtbar gemacht wurden. Nach einstündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Membranen dreimal für insgesamt 15 Minuten mit TN/T-Puffer und dreimal für 3 Minuten mit TN-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die im GE Healthcare „Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent“ Set enthaltenen Reagenzien gemischt und 2 Minuten auf der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann in Folie verpackt und mit einem Fotofilm für die gewünschten Zeiten in einer Kassette inkubiert. Das Prinzip der Detektion beruht darauf, dass die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP das im Reagenz enthaltene Luminol unter alkalischen Bedingungen oxidiert und dadurch in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Licht einer Wellenlänge um 428 nm emittiert,

welches durch Anwesenheit eines Verstärkers potenziert wird und durch den Fotofilm detektiert werden kann. Durch Entwickeln des Films mit dem Kodak GBX Entwickler und Fixierer wurde das Signal auf dem Film sichtbar gemacht (siehe Abbildung 13).

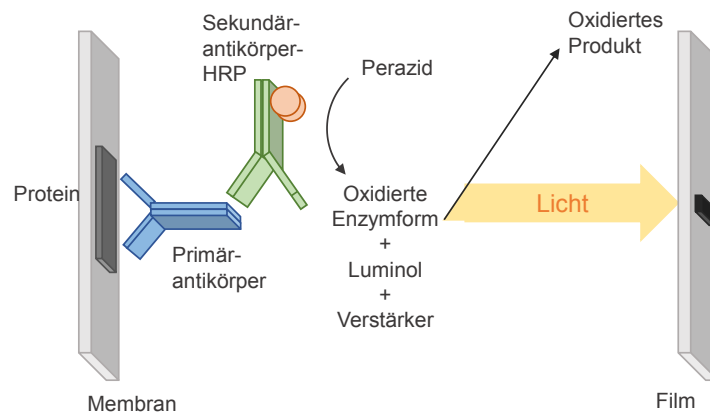


Abbildung 13: Prinzip des Proteinnachweises mit Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Technik. Die auf der Membran gebundenen Proteine werden über den Primärantikörper erkannt. An diesen bindet ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Durch Zugabe des Luminol und Verstärker enthaltenden Reagenz kommt es zur Oxidation und Lichtemission an der Position des Proteins, was durch einen lichtsensitiven Fotofilm sichtbar gemacht werden kann (nach GE Healthcare).

2.3.7 Strippen von Membranen

Für das Anfärben mehrerer Proteine im gleichen Molekulargewichtsbereich oder für Gegenfärbungen eines Proteins auf einer Membran, kann diese zur Entfernung des Antikörpers der ersten Färbung und Wiederfreigabe des Epitops gestrippt werden. Dazu wurde die Membran für 35 Minuten bei 54 °C und unter leichtem Schütteln in mit 2-ME versetztem Strippingpuffer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran einmal kurz und danach zweimal für 10 Minuten mit TN-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Milch in TN/T blockiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit TN/T gewaschen und konnte wieder angefärbt werden. Da beim Strippen auch Protein entfernt wird, lässt sich dieser Prozess nicht unbegrenzt wiederholen.

2.3.8 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Zur quantitativen Auswertung der Western Blots wurden die in der Dunkelkammer erstellten Filme eingescannt und die Proteinbanden mit Hilfe der Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgemessen. Von den Werten, die bei der Messung der Banden gewonnen wurden, wurde ein Leerwert (Hintergrund) abgezogen und die Bandenintensität dann in künstlichen Einheiten angegeben. Sollte das Phosphorylierungssignal eines Proteins untersucht werden, wurde die erhaltene

Bandenintensität zum Signal des Gesamtproteins normiert. Die Expression eines Proteins wurde auf die Expression eines *house keeping*-Proteins wie β -Aktin bezogen. Aus den Werten mehrerer Versuche wurde der Mittelwert bestimmt. Die Daten wurden als ein aus den Mittelwerten erstelltes Diagramm zusammen mit einem repräsentativen Blot dargestellt.

2.3.9 AMPK-Aktivitätsassay

2.3.9.1 IP der β 1-Untereinheit der AMPK

Zur Aktivitätsbestimmung der AMPK erfolgte zunächst eine IP der β -Untereinheit, die nach Literaturdaten mit der katalytischen α -Untereinheit und der γ -Untereinheit copräzipitiert. HUVEC wurden in 90-mm-Zellkulturschalen ausgesät und nach 3 Tagen zunächst 2 Stunden lang in serumfreiem Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder für 20 Minuten mit IL-1 β oder für 5 Minuten mit VEGF (Konzentrationen siehe Tabelle 23) stimuliert. Danach wurden sie auf Eis zweimal mit IP-Wasch-Lysepuffer abgespült und mit 250 μ l IP-Lysepuffer plus Proteinaseinhibitoren für 15 Minuten lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfhütchen überführt und für 6 Minuten bei 700 x g bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte ein *preclearing*-Schritt des Zelllysats, bei dem alle Proteine entfernt wurden, welche unspezifisch an PAS binden. Hierfür wurde pro 0,5 ml Lysat 40 μ l gut gemischte 50 %ige PAS zugegeben und mit dem Lysat 30 Minuten lang bei 4 °C über Kopf gemischt. Danach erfolgte eine Zentrifugierung für 2 Minuten bei 900 x g und 4 °C. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorfhütchen überführt. Je 3 x 5 μ l wurden pro Probe zur Proteinbestimmung nach Lowry (2.3.3) entnommen, um zu gewährleisten, dass von jeder Probe gleichviel Protein für die IP eingesetzt werden konnte. Auch das Volumen der Proben wurde durch Zusatz von IP-Lysepuffer plus Proteinaseinhibitoren vereinheitlicht. Nach Zugabe der Primärantikörper (Tabelle 5) wurden die Proben für 2 Stunden bei 4 °C über Kopf gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 μ l der 50 %igen PAS pro 500 μ g Protein und 1 Stunde Inkubation bei 4 °C und über-Kopf-Mischung. Die Proben wurden danach 2 Minuten bei 900 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer feinen Pipettenspitze abgenommen und das Pellet aus PAS-Beads viermal gewaschen. Dazu wurde es zunächst in 1 ml IP-Wasch-Lysepuffer II resuspendiert, 5 Minuten bei 4 °C über Kopf gemischt und dann 2 Minuten bei 900 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Waschschrift wiederholt. Für die dritte und vierte Waschung wurde der Aktivitätsassay-Waschpuffer verwendet. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand restlos abgesaugt und das Pellet im Aktivitätsassay eingesetzt.

2.3.9.2 Aktivitätsassay

Das Pellet wurde mit 30 µl Aktivitätsassay-Reaktionspuffer versetzt und 10 Minuten unter leichtem Schütteln bei 30 °C inkubiert. In dieser Zeit phosphoryliert AMPK das im Reaktionspuffer enthaltene SAMS-Peptid, die Targetsequenz der AMPK, wobei radioaktiv markiertes ATP eingebaut wird. Die Menge an radioaktiv markiertem SAMS-Peptid ist also ein Maß für die Aktivität der AMPK. Nach Zugabe von 20 µl 40 %iger TCA zum Fällern der Proteine wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25 µl auf P81-Phosphozellulose-Filterpapier gegeben, welches mit seiner negativen Ladung die positiven Ladungen des SAMS-Peptids bindet, so dass eine Trennung des radioaktiv markierten Peptids von überschüssigem freiem radioaktivem ATP durch Waschungen erfolgen konnte. Nach Antrocknen des Filterpapiers wurde dieses sechsmal für 5 Minuten unter leichtem Schwenken mit 0,75 %iger Phosphorsäure gewaschen. Danach erfolgte ein 3-minütiger Waschschrift mit Aceton. Die Filterpapiere wurden getrocknet, in ein 20 ml-*scintillation vial* gegeben, mit 10 ml *scintillation cocktail* versetzt, kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Messung der Radioaktivität am LSC Wallac 1410 erfolgte. Um die eingebauten ATP-Moleküle aus den gemessenen *counts per minute* (cpm) der Proben berechnen zu können, wurden die cpm von 2 µl Aktivitätsassay-Reaktionspuffer mit bekanntem Zusatz an radioaktiv markiertem ATP gemessen. Der Reaktionsansatz wurde auf ein Filterpapier pipettiert, ein unbehandeltes Filterpapier diente als Negativkontrolle. Die Filterpapiere wurden in 20 ml-*Vials* transferiert und nach Zusatz von 5 ml *scintillation cocktail* und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im LSC analysiert.

2.3.10 IF-Färbungen von HUVEC

Für IF-färbungen wurden 100.000 HUVEC auf zweifach mit Gelatine beschichtete Deckgläser von 12 mm Durchmesser ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 4 Stunden mit einzelnen Zytokinen oder dem Zytokinmix entsprechend Tabelle 23 stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden sie einmal mit 37 °C warmem HEPES/CaCl₂/HSA-Puffer gewaschen, 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 µl 1 %igem PFA fixiert und dann zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 8 Minuten mit 500 µl eiskaltem Methanol permeabilisiert. Es folgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt mit Blockierungslösung für IF bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in der feuchten Kammer mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper (Tabelle 6) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS. Daraufhin wurden die Zellen mit 50 µl Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Sekundärantikörper (Tabelle 7) in Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es erfolgten nochmals drei

Waschungen mit PBS und anschließend die Einbettung auf Objektträger mit Fluoromount. Die Auswertung der Färbungen wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.3.11 Durchflussszytometrie

Die Methode der Durchflussszytometrie wird angewendet, um einzelne Zellen auf ihre optischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften hin zu untersuchen. Dabei können in einer Suspension von Zellen verschiedene Zellpopulationen detektiert werden – im Fall der vorliegenden Arbeit waren das Zellen, welche bestimmte Adhäsionsmoleküle unterschiedlich stark exprimieren. Nach Inkubation mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper werden die Zellen einzeln durch einen Laser angeregt und die von ihnen ausgesendeten Fluoreszenzsignale detektiert. Dabei gibt die Fluoreszenzintensität Auskunft über die Expression des angefärbten Proteins und die Streuung des Lichts Auskunft über Zellgröße (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*side scatter*, SSC) der Zelle. So können unterschiedliche Zellpopulationen und auch Zellbestandteile voneinander getrennt werden [117] (Abbildung 14).

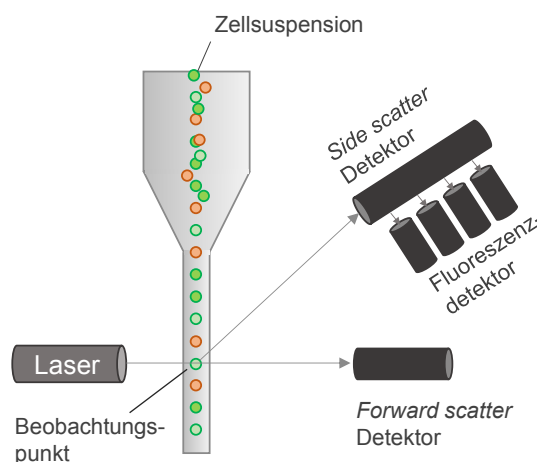


Abbildung 14: Prinzip der Durchflussszytometrie. Im Durchflussszytometer werden vereinzelte Zellen aus einer Zellsuspension mit Laser angeregt. Über die Streuung des Lichts werden Informationen über Zellgröße, Granularität und Fluoreszenz erhalten (verändert nach [117]).

2.3.11.1 Durchflussszytometrie mit AMPK-Aktivatoren

Für die Durchflussszytometrie wurden HUVEC auf 30-mm-Zellkulturschalen ausgesät und 3 Tage kultiviert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte im Wachstumsmedium mit A769662 (5 Stunden) oder AICAR (4 Stunden). Zudem wurden die Zellen für 4 Stunden mit IL-1 β , TNF- α oder Zytokinmix (Tabelle 23) behandelt. Nach Stimulierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend für 2-3 Minuten auf Eis mit 0,5 % PFA fixiert und

wiederum zweimal mit PBS gespült. Danach wurden sie für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) inkubiert, durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren abgelöst und in Stoppmedium überführt. Die restlichen Zellen wurden mit weiteren 1-2 ml Stoppmedium von der Zellkulturschale abgespült, mit der Zellsuspension vereint und für 6 Minuten bei 500 x g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 2 ml PBS nochmals für 6 Minuten bei 500 x g zentrifugiert wurde. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Anschließend erfolgten das Absaugen des Überstands, die Resuspension des Pellets in 120 µl PBS/0,2 % BSA und die Aufteilung der Zellsuspension auf zwei Eppendorfhütchen. Die Proben wurden mit 2 µl Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 (Tabelle 8) für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden sie 6 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl PBS resuspendiert, mit 1 ml PBS versetzt und erneut zentrifugiert (6 Minuten, 500 x g). Anschließend wurde jede Probe in 300 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert (je 20.000 Ereignisse). Die Berechnung des Medians der Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm FlowJo.

2.3.11.2 Durchflusszytometrie mit transfizierten HUVEC

HUVEC wurden auf 30-mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit siRNA gegen die katalytische α 1-Untereinheit der AMPK transfiziert (2.3.1.3) Nach weiteren 72 Stunden Kultivierung wurden die Zellen im Wachstumsmedium mit IL-1 β , TNF- α oder Zytokinmix (Tabelle 23) stimuliert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und wie oben (2.3.11.1) beschrieben weiterbehandelt und gemessen.

2.3.12 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Mit der Methode des ECIS kann das Verhalten adhärenter Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden dazu in spezielle Zellkulturgefäße ausgesät, in denen sich zwei einander gegenüberliegende Goldelektroden befinden (Abbildung 15). An diese Elektroden wird ein konstanter Wechselstrom von 1 µA mit einer gewählten Frequenz angelegt. Die Impedanz errechnet sich dann durch die zwischen den Elektroden entstehenden wechselnden Spannungen (in mV). So kann zum einen gemessen werden, wann eine Endothelzellschicht zur Konfluenz herangewachsen ist und eine stabile Barriere bildet. Zum anderen kann gemessen werden, wie diese Barriere durch verschiedene Substanzen erhöht oder verringert wird [118]. Für die Versuche dieser Arbeit wurde die ECIS-Methode gewählt, um Veränderung der Barriere einer Endothelzellschicht nach Stimulierung mit proinflammatorischen Mediatoren zu messen. Zur ECIS-Messung wurden 8W10E-Arrays verwendet, welche zunächst wie in 2.3.1.2 beschrieben mit Gelatine beschichtet wurden.

Nach Vorlegen von 200 μl 37 °C warmem Wachstumsmedium pro Well und Überprüfung des richtigen Sitz des Arrays wurde 200 μl einer vorgewärmten Zellsuspension von Primärzellen mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/ml in das vorgelegte Wachstumsmedium pipettiert, so dass sich letztendlich in jedem Well 50.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 400 μl Medium befanden. Die Messung wurde bei 6000 Hz und einem Messintervall von 120 Sekunden gestartet. Die Stimulierung erfolgte, nachdem die Zellen konfluent waren, also ein Plateau im Widerstand erreicht worden war, welches für mindestens 5 Stunden bestanden haben sollte. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und durch serumarmes Wachstumsmedium ersetzt. Nach 1,5 Stunden erfolgte eine Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α , LPS oder Zytokinmix (Tabelle 23). Dabei wurden die Lösungen in den Wells zur besseren Verteilung der Stimuli vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Kontrollen ohne Stimuluszusatz wurden auf gleiche Weise behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Messung beendet. Für die Auswertung wurden die Impedanz-Werte bestimmter Zeitpunkte mehrerer Versuche gemittelt und als Kurve dargestellt.

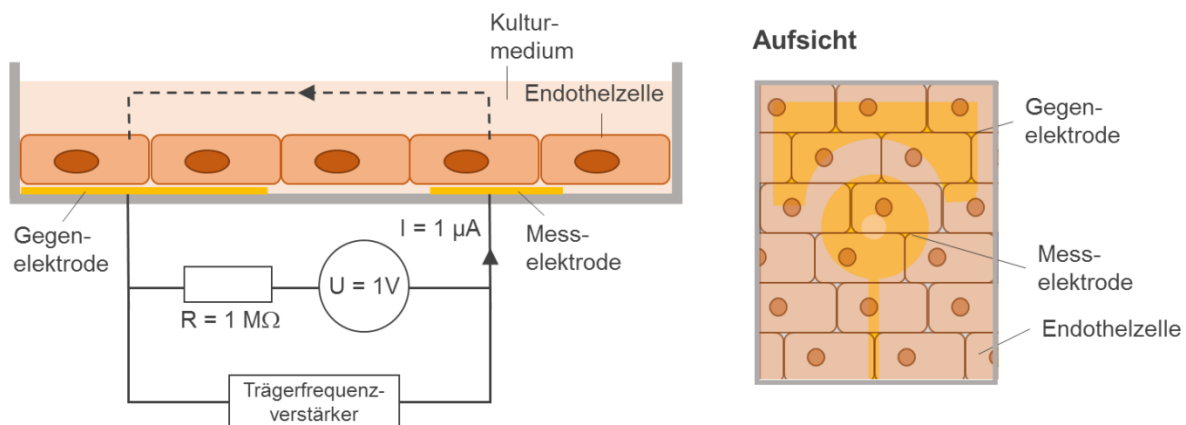


Abbildung 15. Prinzip der Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Messung. Zellen werden in Kulturmedium in einem Reaktionsgefäß ausgesät, in dem sich sowohl eine Mess- als auch eine Gegenelektrode aus Gold befinden. Diese sind mit einem Trägerfrequenzverstärker verbunden. Über einen 1 M Ω -Resistor wird ein Wechselstromsignal angelegt, wodurch eine konstante Stromquelle kreiert wird. Die Impedanz errechnet sich dann durch die entstehenden Spannungen zwischen den Elektroden. Die Zellen können jederzeit durch Zugabe eines Stimulus ins Medium stimuliert werden und die Veränderung der Impedanz kann detektiert werden (nach [118]).

2.3.12.1 ECIS mit transfizierten HUVEC

Um ECIS-Messungen mit Zellen durchzuführen, in welchen die katalytische AMPK α 1-Untereinheit herunterreguliert worden war, wurden zunächst Primärzellen auf 30-mm-Zellkulturgefäße zur Transfektion ausgesät. Die Zellen wurden wie in 2.3.1.3 beschrieben mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen AMPK α 1-Untereinheit transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf den ECIS-Array ausgesät. Die Messung und Stimulierung der Zellen mit Zytokinmix erfolgte wie oben beschrieben (2.3.12).

2.3.12.2 ECIS mit AICAR

In Versuchen, in welchen der Einfluss der AMPK-Aktivierung durch AICAR untersucht werden sollte, wurden die Zellen wie oben beschrieben (2.3.12) ausgesät und die Messung gestartet. Nach Erreichen eines Plateaus wurden die Zellen zunächst für 1 Stunde mit AICAR (siehe Tabelle 23, Langzeitstimulierung) stimuliert und anschließend wurde Zytokinmix zugegeben (Tabelle 23). Die Stimulierungen sowie Messung und Auswertung des Versuchs wurden wie oben beschrieben (2.3.12) durchgeführt.

2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mehrerer Versuche + Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz eines Unterschieds zwischen zwei Gruppen wurde ein t-Test herangezogen, mehrere Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit Sidak-Holm-Korrektur überprüft. Dabei wurde für Zeitabhängigkeiten ANOVA mit *Repeated Measurement* verwendet. Wurden zwei Parameter beurteilt, erfolgte die Anwendung von zweifacher ANOVA. Die statistische Signifikanz bei der Überlebensstudie wurde mit dem Gehan-Breslow Test getestet. Es wurde jeweils ein p-Wert von kleiner als 0,05 als statistisch signifikant angesehen und wie in der Legende erklärt gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Beeinflussung einer systemischen Entzündungsreaktion durch AMPK α 1 *in vivo*

Da AMPK nach Literaturangaben endothelzellprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften aufweist, sollte als Erstes ihre Rolle bei systemischer Entzündung *in vivo* untersucht werden. Aufgrund der Prädominanz der katalytischen α 1-Isoform im Endothel, wurden für die Versuche AMPK α 1-KO-Mäuse eingesetzt und mit ihren WT-Zuchtgeschwistern verglichen. Die Auslösung einer Endotoxämie durch LPS-Injektion wurde als Modell für eine systemische Entzündungsreaktion gewählt.

3.1.1 Einfluss von AMPK α 1-KO auf die LPS-induzierte systemische Inflamationsantwort

Zunächst sollte anhand der Messung der Plasma-Zytokinspiegel die systemische Entzündungsantwort nach LPS-Injektion überprüft und mögliche Unterschiede zwischen AMPK α 1-KO- und WT-Mäusen verifiziert werden. Unter unbehandelten Bedingungen waren weder in KO- noch in WT-Mäusen Plasmazytokine nachweisbar (Daten nicht dargestellt). 6 Stunden nach LPS-Injektion stiegen proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-6 und MCP-1 sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 im Plasma beider Maus-Genotypen an (Abbildung 16A).

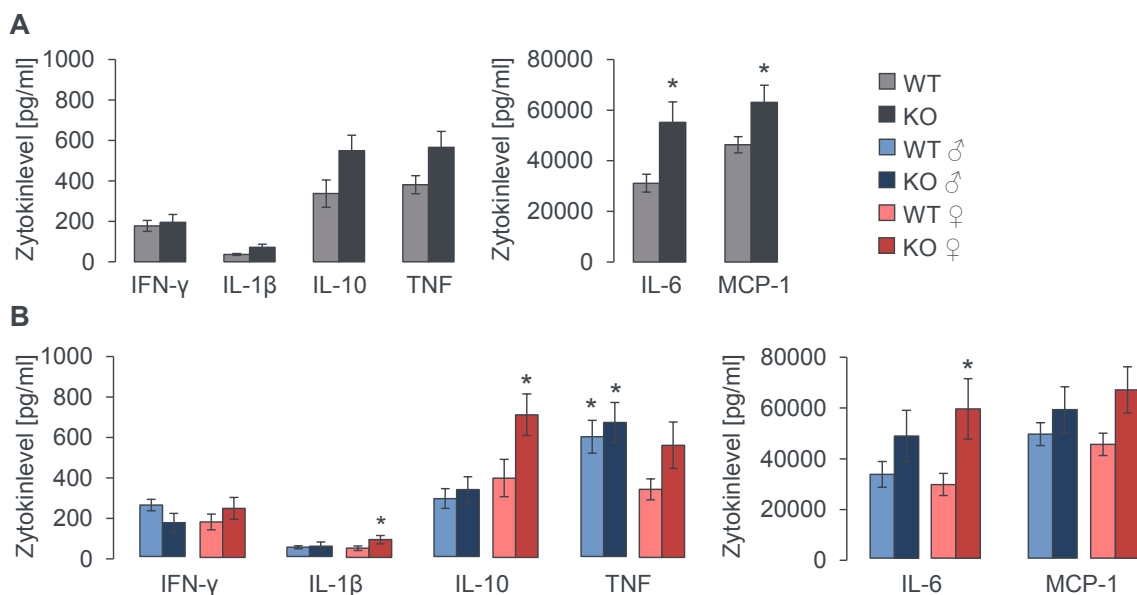


Abbildung 16: AMPK α 1-KO-Weibchen zeigen eine erhöhte systemische Inflamationsantwort. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS injiziert. Nach 6 Stunden wurde den Mäusen Blut aus dem Herzen entnommen und im Plasma mit Hilfe der CBA Multiplex-Analyse der Zytokingehalt bestimmt. **A** Gesamtauswertung **B** Auswertung für Männchen (blau, n=6-8 pro Genotyp) und Weibchen (rot, n=13-18 pro Genotyp) getrennt, (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zu WT Weibchen).

Dabei war die Zytokin-Konzentration im Plasma der AMPK α 1-KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen im Allgemeinen höher, dies war für IL-6 (plus 77,1 %) und MCP-1 (plus 36,1 %) statistisch zu sichern. Wurden die Zytokinwerte getrennt nach männlichem und weiblichem Geschlecht betrachtet, zeigten sich bei weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen im Vergleich zu weiblichen WT-Mäusen stärkere Veränderungen (Abbildung 16B). IFN- γ , IL-1 β , IL-10, TNF, IL-6 und MCP-1 waren um 38,3 %, 92,2 %, 79,7 %, 64,7 %, 102,6 % beziehungsweise 47,9 % erhöht, wobei die Unterschiede bei IL-10 und IL-6 statistisch signifikant waren. Männliche AMPK α 1-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu männlichen WT-Tieren nur Tendenzen zu erhöhten Zytokinspiegeln (TNF, IL-6, MCP-1). WT-Männchen wiesen gegenüber WT-Weibchen signifikant höhere TNF-Konzentrationen auf (plus 75,9 %) (Abbildung 16B). Weibliche AMPK α 1-KO-Mäuse reagierten also insgesamt mit einer verstärkten frühen systemischen Inflammationsantwort auf eine LPS-Injektion.

3.1.2 Einfluss von AMPK α 1-KO auf das Überleben nach LPS-Injektion

In einer Überlebensstudie wurde nun die LPS-induzierte Mortalität untersucht. Basierend auf der Pilotstudie (Abbildung 17) wurde den Mäusen dabei 20 μ g/g KG LPS injiziert.

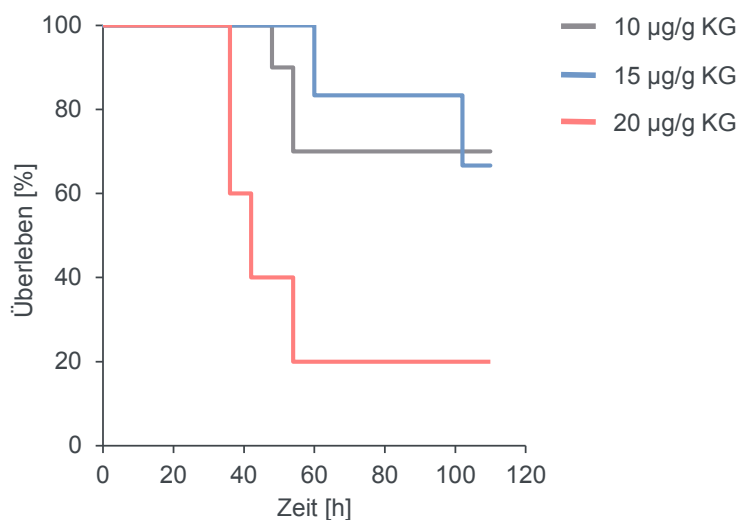


Abbildung 17: Dosistest zur Überlebensstudie. WT-Mäusen wurde unter Isoflurannarkose intraperitoneal 10, 15 oder 20 μ g/g KG LPS in einem Gesamtinjektionsvolumen von 500 μ l 0,9 % NaCl injiziert. Anschließend wurde alle 6 Stunden der Gesundheitszustand der Mäuse überprüft und verstorbene Tiere erfasst. Auswertung dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. n=5-10 pro Gruppe.

Abbildung 18A zeigt, dass insgesamt 54 % der WT-Mäuse, jedoch nur 29 % der AMPK α 1-KO-Mäuse eine einmalige LPS-Injektion überlebten. Dabei war – werden die Daten nach Geschlecht getrennt betrachtet – der Unterschied bei weiblichen Mäusen maßgebend. Weibliche WT-Mäuse zeigten eine Mortalität von 33,3 %, während diese bei AMPK α 1-KO-

Weibchen bei 83,3 % lag (Abbildung 18B). Die Mortalität der männlichen Tiere lag sowohl für den WT- als auch für den AMPK α 1-KO-Genotyp bei 58,3 %. Insgesamt reagierten Weibchen, die generell ein besseres Überleben zeigen, auf einen Verlust der AMPK α 1 mit einer deutlich höheren Mortalität.

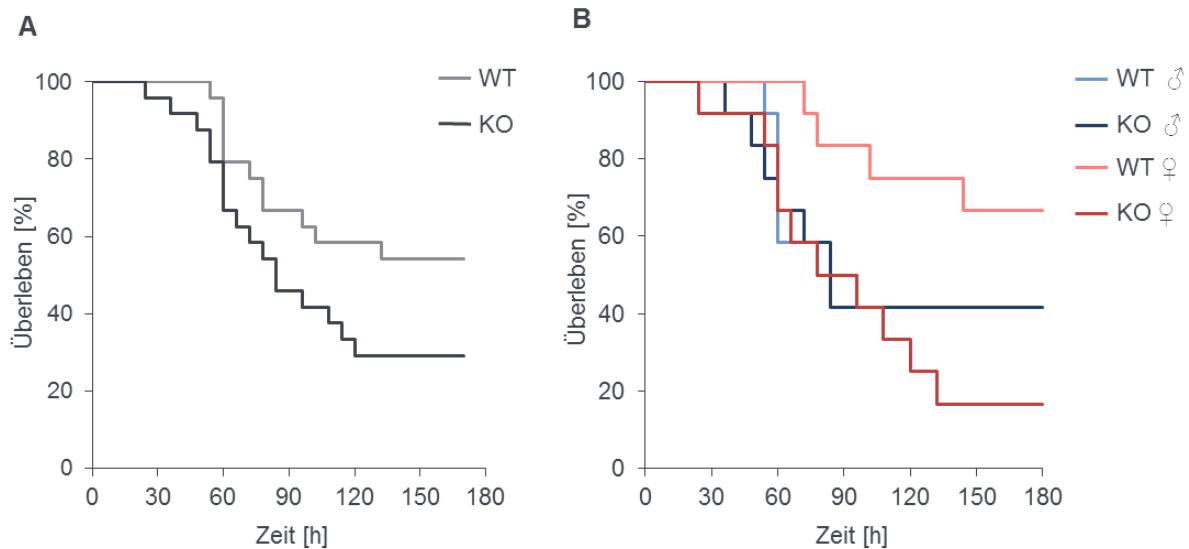


Abbildung 18: AMPK α 1-KO-Weibchen zeigen nach LPS-Injektion eine signifikant erhöhte Mortalität. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde unter Isoflurannarkose intraperitoneal 20 μ g/g KG LPS in einem Gesamtinjektionsvolumen von 500 μ l 0,9 % NaCl injiziert. Anschließend wurde alle 6 Stunden der Gesundheitszustand der Mäuse überprüft und verstorbene Tiere erfasst. **A** Gesamtauswertung **B** Auswertung für Männchen (blau) und Weibchen (rot) getrennt dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. (Gehan-Breslow Test) n=12 pro Genotyp und Geschlecht.

3.1.3 Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Permeabilität der Gefäße

Um Veränderungen der Endothelzellfunktion nach LPS-Applikation zu erfassen, wurde ein *Organ leakage Assay* durchgeführt. Damit wird die Barrierefunktion der Endothelzellen erfasst, die normalerweise einen kontrollierten Austausch von Ionen, gelösten Molekülen und Flüssigkeiten ermöglicht. Die im Falle einer systemischen Entzündung ausgeschütteten Zytokine aktivieren das Endothel, so dass die Barriere durch Veränderungen der Zellstruktur gelockert und die Einwanderung von Zellen und Proteinen in das Gewebe ermöglicht wird. Mit Hilfe des *Organ leakage Assay* sollte untersucht werden, ob eine veränderte vaskuläre Permeabilität nach LPS-Injektion in den Mäusen nachzuweisen ist und ob diese durch die Depletion von AMPK α 1 beeinflusst wird.

Abbildung 19A zeigt, dass eine LPS-Injektion in WT-Mäusen nach 6 Stunden zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität in Nieren und Leber um 34,6 % (statistisch signifikant) beziehungsweise 29,8 % führte. Darüber hinaus ist zu sehen, dass AMPK α 1-KO-Mäuse eine signifikant höhere Permeabilitätssteigerung (plus 40,8 %) in der Leber aufweisen.

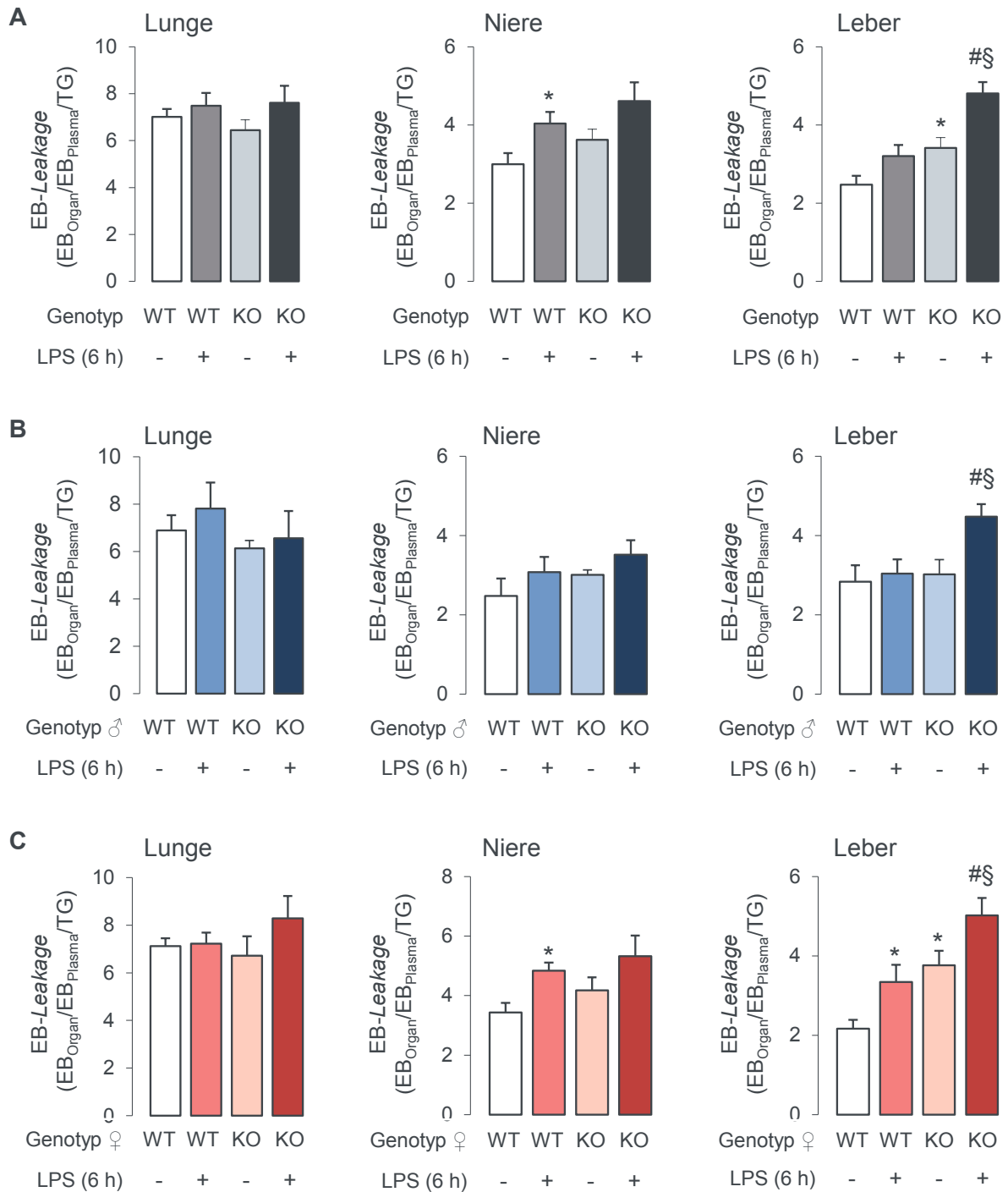


Abbildung 19: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine verstärkte Permeabilitätserhöhung in der Leber. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert und für 6 Stunden ein *Organ Leakage Assay* durchgeführt. Der *Evans Blue*-Gehalt der Organe wurde auf Hämoglobingehalt, *Evans Blue*-Gehalt des Plasmas und Trockengewicht des jeweiligen Organs korrigiert. **A** Gesamtauswertung **B** Auswertung für Männchen (blau, n=9-10 pro Genotyp) **C** Auswertung für Weibchen (rot, n=10-14 pro Genotyp). (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur WT Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu KO Kontrolle, § p<0,05 im Vergleich zu WT LPS).

Geschlechtsspezifisch ausgewertet zeigen die Daten in Abbildung 19B, dass LPS in WT-Männchen nach 6 Stunden noch keine Barrierestörung auslöste, während in der Leber der AMPK α 1-KO-Männchen bereits eine signifikante Permeabilitätserhöhung nachweisbar war (plus 47,9 %). Bei weiblichen WT-Mäusen führte LPS in Nieren und Leber zu einer Steigerung der vaskulären Permeabilität um plus 40,9 % beziehungsweise plus 54,4 % (Abbildung 19C). AMPK α 1-KO-Weibchen reagierten dabei noch stärker auf die systemische LPS-Gabe. Das wurde vor allem in der Leber dieser Tiere deutlich, wo eine signifikante Erhöhung der Permeabilität um 33,4 % gegenüber LPS-behandelten WT-Weibchen nachweisbar war. Tendenzen zur erhöhten vaskulären Permeabilität waren aber auch in Lunge und Niere ersichtlich. Die basale vaskuläre Permeabilität in der Leber von AMPK α 1-KO-Weibchen war im Vergleich zu WT-Weibchen signifikant gesteigert (plus 73,6 %) und entsprach etwa dem Wert, der in LPS-behandelten WT-Weibchen gemessen wurde.

3.1.4 Einfluss von AMPK α 1-KO und LPS auf Zytokinexpression und Leukozyten-einwanderung in der Leber

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob die stärkere Störung der Barrierefunktion in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen nach systemischer LPS-Gabe mit einer erhöhten lokalen Entzündungsreaktion einhergeht. Dazu wurden Zytokinspiegel in Leberhomogenaten gemessen.

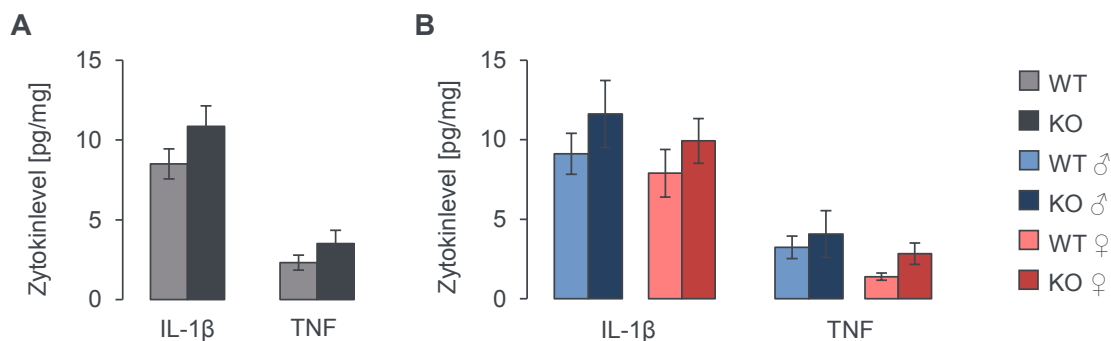


Abbildung 20: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion leicht erhöhte Zytokinspiegel in der Leber. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS injiziert. Nach 6 Stunden wurde den Mäusen die Leber entnommen. Im Leberlysat wurde mit Hilfe der CBA Multiplex-Analyse der Gehalt an Zytokinen bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen. **A** Gesamtauswertung **B** Auswertung für Männchen (blau, n=6 pro Genotyp) und Weibchen (rot, n=5 pro Genotyp) getrennt (Mittelwert +/- SEM).

Unter unbehandelten Bedingungen waren weder in KO- noch in WT-Mäusen Zytokine in Leberhomogenaten nachweisbar (Daten nicht dargestellt). In der Leber LPS-behandelter AMPK α 1-KO-Mäuse konnte mehr TNF (plus 52 %) und IL-1 β (plus 28 %) nachgewiesen werden als in der Leber von WT-Mäusen (Abbildung 20A), obwohl das statistisch noch nicht

zu sichern war. Die Tendenz zur erhöhten Zytokinexpression in der Leber war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen zu erkennen (Abbildung 20B).

Des Weiteren wurden polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMN) in Paraffin-Leberschnitten der Tiere angefärbt. Hierbei war eine Einwanderung von PMN-positiven Zellen 6 Stunden nach LPS-Gabe in allen untersuchten Präparaten erkennbar (Abbildung 21A+B). Dabei konnten in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen etwa 12,5 % mehr PMN-positive Zellen gezählt werden (Abbildung 21C), ohne dass es geschlechtsspezifische Unterschiede gab.

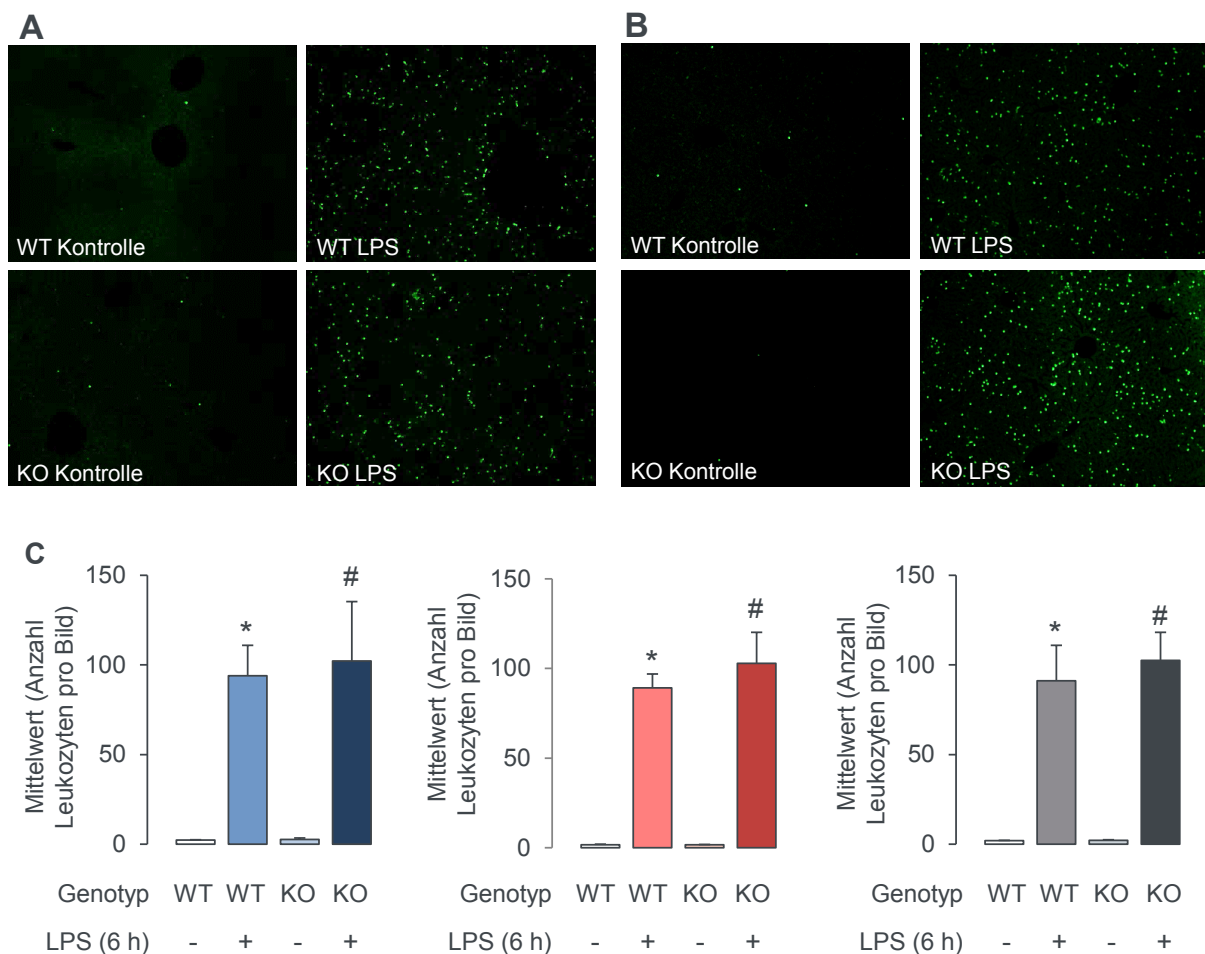


Abbildung 21: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine gering verstärkte Einwanderung von Leukozyten in die Leber. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert. Die Leber wurde nach 6 Stunden mit PBS perfundiert, mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 6- μ m-Gewebeschnitte wurden mit einem Antikörper gegen PMN angefärbt. In Bildern in 200-facher Vergrößerung wurden PMN-positive Zellen mit dem Programm Image J gezählt. Gezeigt sind **A** ein repräsentatives Bild von Lebern männlicher Tiere, n=3 pro Bedingung, **B** ein repräsentatives Bild von Lebern weiblicher Tiere, n=3 pro Bedingung, und **C** die quantitative Auswertung von zwei Bildern des großen Leberlappens und je einem Bild der kleinen Leberlappen pro Maus (Männchen (blau), Weibchen (rot), Gesamtauswertung (grau), Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur WT Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu KO Kontrolle).

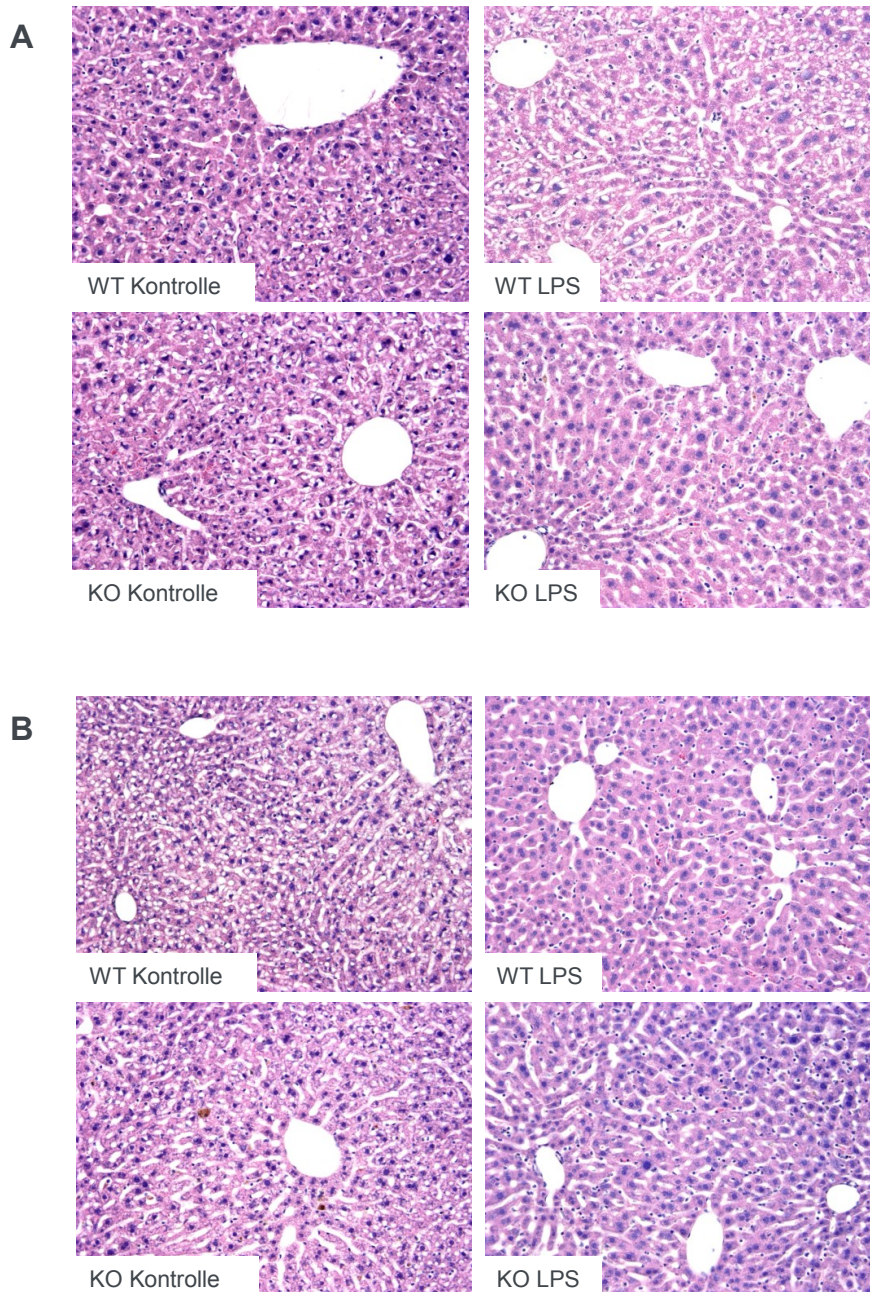
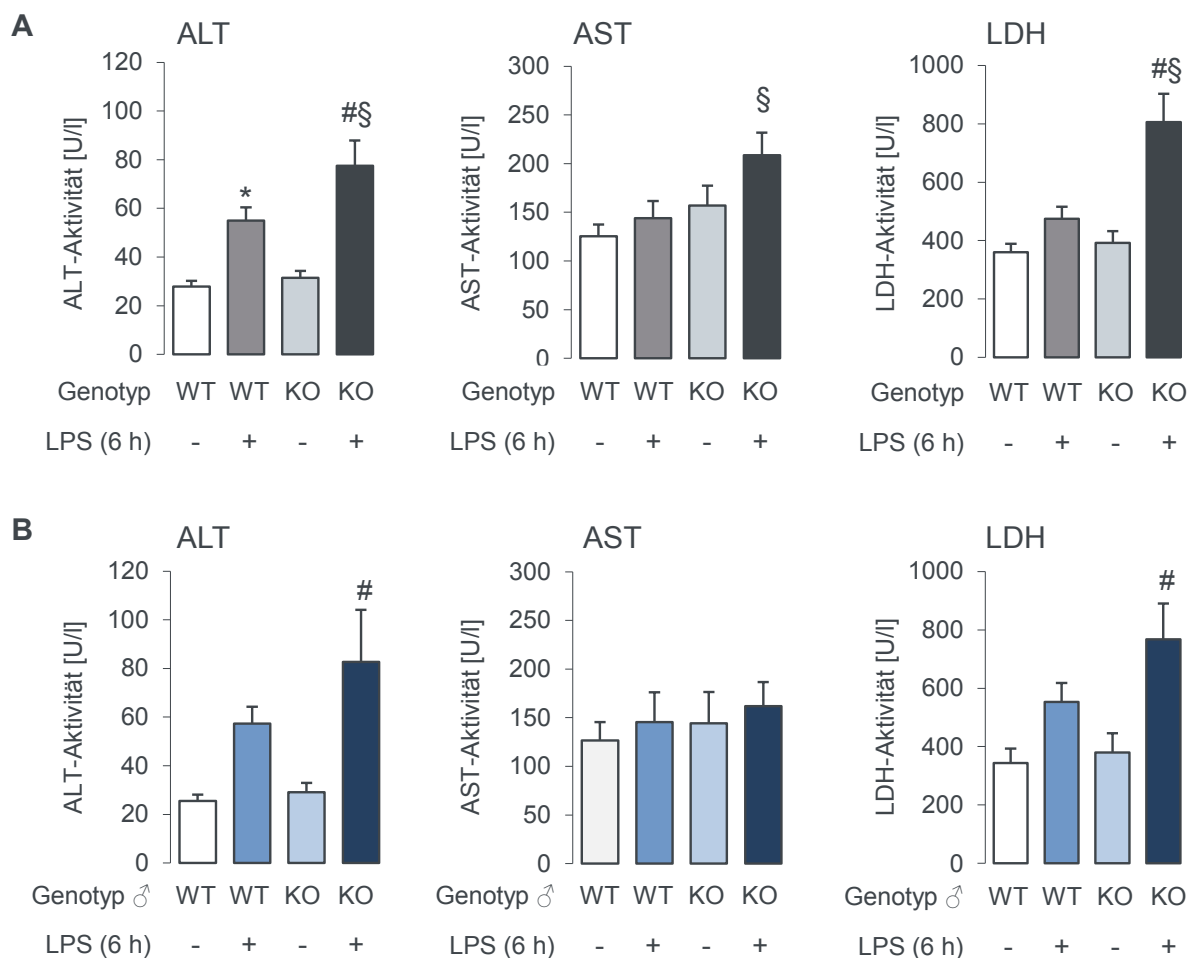


Abbildung 22: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen keine Unterschiede in der Gesamtleberstruktur 6 Stunden nach LPS-Injektion. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert. Die Leber wurde nach 6 Stunden mit PBS perfundiert, mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 6- μ m-Gewebeschnitte wurden einer HE-Färbung unterzogen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild (200-fache Vergrößerung) pro Bedingung, **A** Bilder von Lebern männlicher Tiere, n=3 pro Bedingung, **B** Bilder von Lebern weiblicher Tiere, n=4 pro Bedingung.

Die Gesamtstruktur der Leber war zu diesem frühen Zeitpunkt nach LPS-Gabe (6 Stunden) nicht sichtbar geschädigt. Dies wurde anhand des Vergleichs von HE-Färbungen von Lebern der einzelnen Mausgruppen nachgewiesen (männliche und weibliche Tiere, LPS-behandelte und unbehandelte, WT- und AMPK α 1-KO) (Abbildung 22A und B).

3.1.5 Einfluss des AMPK α 1-KO auf Zellschädigung

Um zu untersuchen, ob die erhöhte vaskuläre Permeabilität in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen mit einer Funktionsstörung des Organs einher geht, wurden Leberschädigungsparameter im Plasma, welches den Mäusen 6 Stunden nach LPS-Injektion entnommen worden war, gemessen. Es erfolgte die Bestimmung der Aktivität der Transaminasen AST, ALT sowie der LDH. Eine erhöhte Aktivität von AST und ALT weisen besonders auf Leberschädigungen hin, wobei ALT nahezu leberspezifisch ist. Eine erhöhte LDH-Aktivität im Plasma zeigt mit hoher Sensitivität Zellschädigungen an. Abbildung 23A zeigt, dass AMPK α 1-KO-Mäuse schon zu einem frühen Zeitpunkt eine signifikant höhere Zellschädigung aufwiesen als WT-Mäuse. Dabei zeigten weibliche und männliche AMPK α 1-KO-Mäuse etwa vergleichbare Veränderungen der ALT und LDH-Werte, während die Erhöhung der AST-Aktivität nur in Weibchen zu beobachten war (Abbildung 23B+C). Die gemessenen Plasmaparameter deuten auf eine frühe erhöhte Leberschädigung bei männlichen und weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen hin.



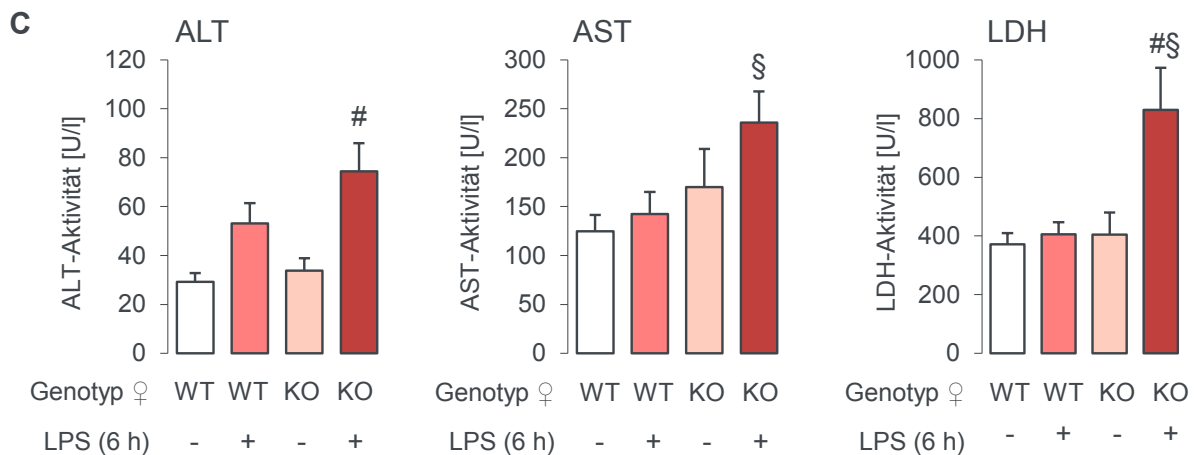


Abbildung 23: AMPK α 1-KO-Mäuse weisen eine erhöhte LPS-induzierte Leberschädigung auf. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert. Nach 6 Stunden wurde den Mäusen Blut aus dem Herzen im Plasma mithilfe des Fuji Dry Chem Analysegeräts die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST), der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Laktat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. **A** Gesamtauswertung **B** Auswertung für Männchen (Kontrolle n=5-6 und LPS n=7-8 pro Genotyp) **C** Auswertung für Weibchen (Kontrolle n=6-8 und LPS n=9-12 pro Genotyp) (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur WT Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu KO Kontrolle, § p<0,05 im Vergleich zu WT LPS).

3.1.6 Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Veränderungen der CD31-Expression in der Leber

Da AMPK α 1-KO-Mäuse eine signifikant erhöhte vaskuläre Permeabilität in der Leber aufweisen, wurde im Folgenden überprüft, ob dieser Effekt auf Störungen der Struktur sinusoidaler Endothelzellen zurückzuführen ist. Dazu erfolgen deshalb in immunhistochemische und Western-Blot-Analysen des Endothelmarkers CD31 in Paraffin-Leberschnitten beziehungsweise in Leberlysaten. Abbildung 24A zeigt, dass sinusoidale Endothelzellen von unbehandelten WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen CD31 in gleichem Maße exprimierten. Eine 6-stündige LPS-Behandlung führte sowohl von WT- als auch von AMPK α 1-KO-Mäusen zu einer schwächeren Färbung von CD31 im Lebergewebe, was auf einen Verlust von Endothelzellen schließen lässt. Die Verminderung der CD31-Expression nach LPS war auch im Western Blot zu sehen (Abbildung 24B). Tendenziell war ein stärkerer Verlust von CD31 nach systemischer LPS-Gabe in AMPK α 1-KO-Mäusen zu sehen, statistisch aber nicht nachzuweisen. In diesen Untersuchungen waren keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

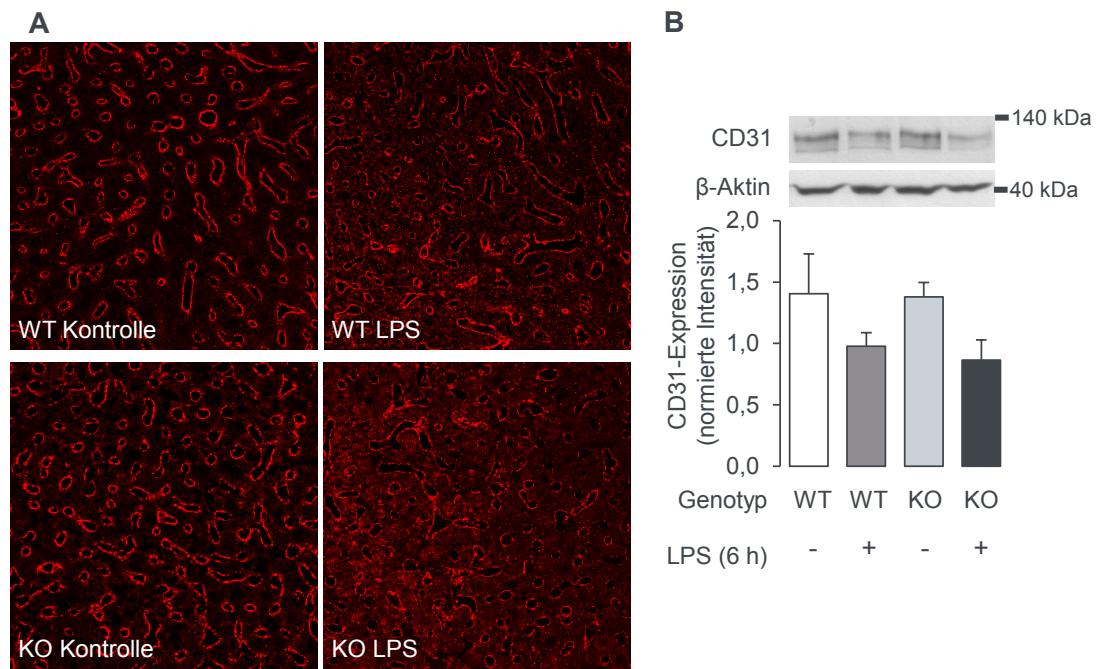


Abbildung 24: LPS führt zur Schädigung des sinusoidalen Endothels. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert. **A** Für immunhistochemische Analysen wurde die Leber nach 6 Stunden mit PBS, mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 6- μ m-Gewebeschnitte wurden mit einem Antikörper gegen CD31 angefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild (630-fache Vergrößerung) pro Bedingung, n=4. **B** Für Western-Blot-Analysen wurde 6 Stunden nach Injektion die Leber entnommen und lysiert. Im Blot wurde die Expression von CD31 nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot sowie die densitometrische Auswertung n=5-6 für alle Gruppen (Mittelwert \pm SEM).

3.1.7 Einfluss von AMPK α 1-KO auf LPS-induzierte Veränderungen der Expression von Claudin-5 in der Leber

Die endotheliale Permeabilität wird auch in der Leber durch Zell-Zell-Verbindungen – vor allem durch *tight junction*-Proteine – kontrolliert [1]. Als nächstes wurde daher untersucht, ob die in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen beobachtete Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch Veränderungen des endothelspezifischen *tight junction*-Proteins Claudin-5, welches auch in Leber-Sinusoiden funktionell relevant ist, hervorgerufen wird. Abbildung 25A zeigt, dass Claudin-5 in den sinusoidalen Endothelzellen von gesunden WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen exprimiert ist. Nach LPS-Behandlung wurde das Claudin-5-Signal schwächer und diffuser, was in den Leberschnitten von AMPK α 1-KO-Mäusen noch deutlicher zu beobachten war. Der Western Blot spiegelt dieses Ergebnis (Abbildung 25B) wider. In den Leberlysaten von WT-Mäusen war eine signifikante Reduktion von Claudin-5 um 36,4 % zu sehen. Dagegen führte LPS im Lebergewebe von AMPK α 1-KO-Mäusen zu einer signifikanten Verminderung der Claudin-5-Expression um 54,1 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren waren hier nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

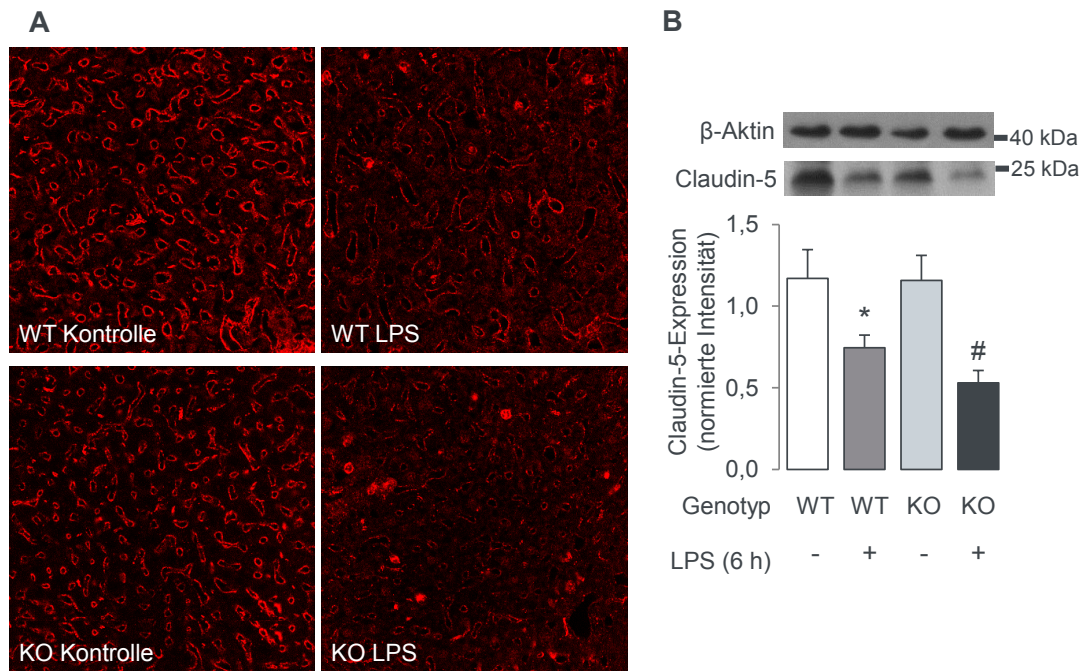


Abbildung 25: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine stärkere Verminderung der Claudin-5-Expression in der Leber. WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen wurde intraperitoneal 10 μ g/g KG LPS beziehungsweise 10 μ l/g KG 0,9 % NaCl injiziert. **A** Für immunhistochemische Analysen wurde die Leber nach 6 Stunden mit PBS, mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 6- μ m-Gewebeschnitte wurden mit einem Antikörper gegen Claudin-5 angefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild (630-fache Vergrößerung) pro Bedingung, jeweils n=4 **B** Für Western Blot Analysen wurde 6 Stunden nach Injektion von LPS die Leber entnommen und lysiert. Im Western Blot wurde die Expression von Claudin-5 nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot sowie die densitometrische Auswertung n=9 für alle Gruppen (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur WT Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu KO Kontrolle).

3.2 Wirkung proinflammatorischer Mediatoren auf HUVEC

Die Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit deuten auf eine vaskuloprotektive Funktion der AMPK unter Bedingungen der systemischen Entzündung hin. Im Folgenden sollte nun *in vitro* genauer die Wechselwirkung zwischen inflammatorischen Stimuli und der AMPK im Endothel untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die Wirkung proinflammatorischer Mediatoren in den als Zellmodell verwendeten HUVEC überprüft. Als Stimuli wurden LPS, IL-1 β und TNF- α eingesetzt. LPS löst als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien Entzündungsantworten aus und wurde auch in den *in-vivo*-Versuchen eingesetzt. IL-1 β und TNF- α werden unter systemischen Inflamationsbedingungen zu frühen Zeitpunkten freigesetzt und sind dann in hohen Konzentrationen ebenfalls im Blut nachweisbar. Eine kombinierte Stimulierung der Zellen mit allen drei Substanzen – dem sogenannten Zytokinmix [119] – sollte systemische Inflamationsbedingungen simulieren. Um die inflammatorische Antwort der Endothelzellen zu charakterisieren, wurden verschiedene Signalwege sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Veränderung der endothelialen Barrierefunktion untersucht.

3.2.1 Proinflammatorische Signalwege in HUVEC

In der Literatur wird beschrieben, dass IL-1 β , TNF- α und LPS über ihre jeweiligen Rezeptoren zur Initiierung inflammatorischer Reaktionen in Endothelzellen führen. Dazu gehören unter anderem die Aktivierung von MAPK wie p38 MAPK und ERK1/2. Diese Signalwege wurden zeitabhängig nach Stimulierung von HUVEC mit dem Zytokinmix im Western Blot analysiert. Abbildung 26 zeigt eine transiente Phosphorylierung von p38 MAPK und ERK1/2 zwischen 5 und 30 Minuten nach Stimuluszugabe und eine Rückkehr zum Ausgangsniveau nach 60 Minuten. Die Stimulierung mit den einzelnen Substanzen IL-1 β , TNF- α oder LPS zeigte ähnliche Ergebnisse, wobei die Reaktion nach LPS-Stimulierung zeitlich leicht verzögert ablief (Daten siehe Anhang 6.2.1, Abbildung S. 43A-C).

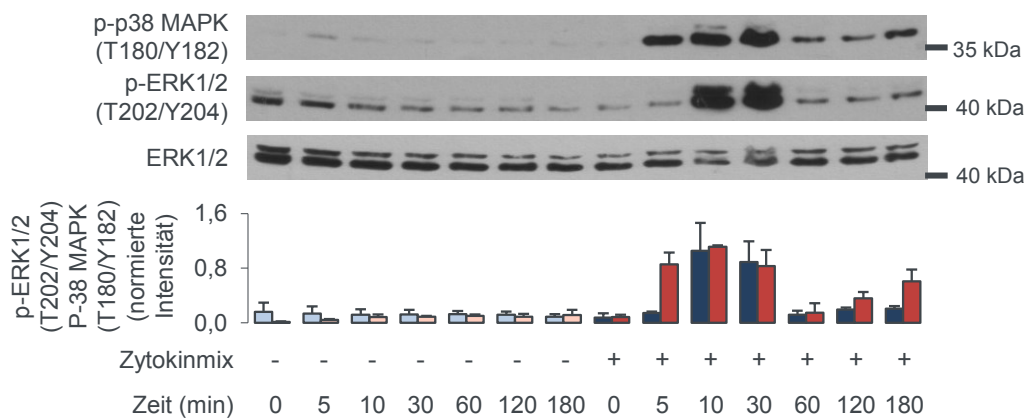


Abbildung 26: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix aktiviert MAPK. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung der MAPK nachgewiesen. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der p38 MAPK (rot)- und ERK1/2-Phosphorylierung (blau) von 2 Blots (Mittelwert \pm SEM, n=2).

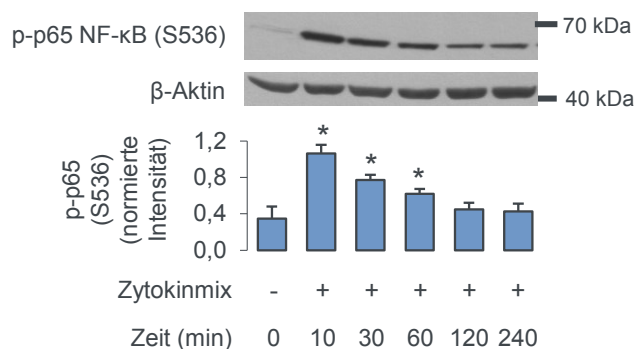


Abbildung 27: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix aktiviert NF- κ B. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS stimuliert und lysiert. Im Western Blot wurde die S536-Phosphorylierung von p65 NF- κ B nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot sowie die densitometrische Auswertung, (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle) n=3.

Über den MAPK-Signalweg können Zytokine und LPS den heterodimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren. Als Indikator dieser Aktivierung dient die Phosphorylierung der p65-Untereinheit am Serinrest 536 (S536). Abbildung 27 zeigt, dass, wie erwartet, 10 Minuten nach Zusatz des Zytokinmix zu HUVEC eine signifikante Phosphorylierung der p65-Untereinheit nachweisbar ist, welche im untersuchten Zeitraum bis zu 4 Stunden anhält, dabei aber schwächer wird.

3.2.2 Expression von Adhäsionsmolekülen in HUVEC

Eine typische Entzündungsreaktion von Endothelzellen ist die NF- κ B-abhängige Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, welche die Adhäsion und Einwanderung von Immunzellen in das entzündete Gewebe vermitteln.

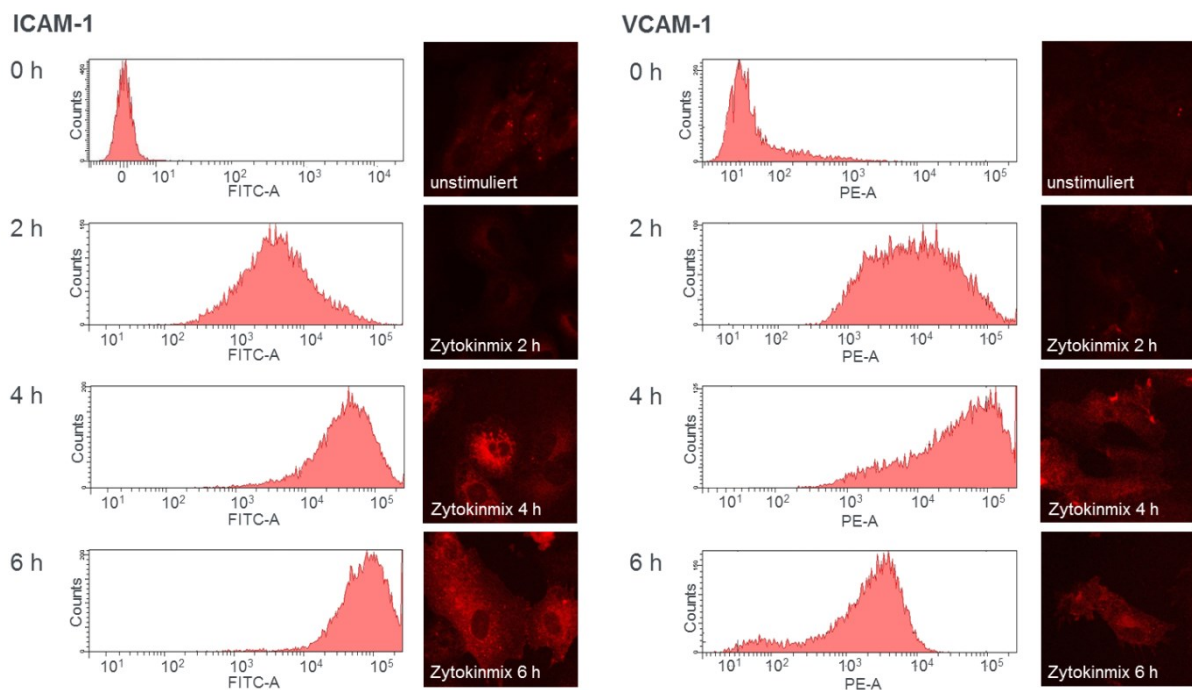


Abbildung 28: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen. HUVEC wurden für entsprechende Zeiten mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS behandelt. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen anschließend fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen fixiert, trypsiniert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt Histogramme und Beispielbilder (200-fache Vergrößerung) der zeitabhängigen ICAM-1 und VCAM-1-Expression eines Experiments.

Abbildung 28 zeigt, dass 2 Stunden nach Zytokinmix-Zusatz eine deutliche Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in HUVEC nachweisbar war. Dies war sowohl in Durchflusszytometrie- als auch in Immunfluoreszenz-Analysen sichtbar. Die ICAM-1-Expression wird bei längerer Inkubation weiter gesteigert und hält bis zu 24 Stunden an (Daten siehe Anhang 6.2.2,

Abbildung S. 44A). Die VCAM-1-Expression hingegen war transient, erreichte nach 4 Stunden ein Maximum und wurde dann wieder schwächer. Auch IL-1 β und TNF- α allein sowie in geringerem Maße auch LPS führten zu einer ICAM-1- und VCAM-1-Expression (Daten siehe Anhang 6.2.2, Abbildung S. 44B+C).

3.2.3 Beeinflussung der Barrierefunktion durch proinflammatorische Mediatoren in HUVEC

Wie *in vivo* gezeigt werden konnte, geht eine systemische Entzündung mit einer endothelialen Barriestörung einher. Diese sollte nach Stimulierung von HUVEC mit IL-1 β , TNF- α und LPS *in vitro* charakterisiert werden. Dazu wurde die ECIS-Technologie herangezogen, die auf der Messung der Impedanz an zellbedeckten Elektroden beruht. Wird die Zellschicht durchlässiger, so sinkt der Wechselstromwiderstand ab.

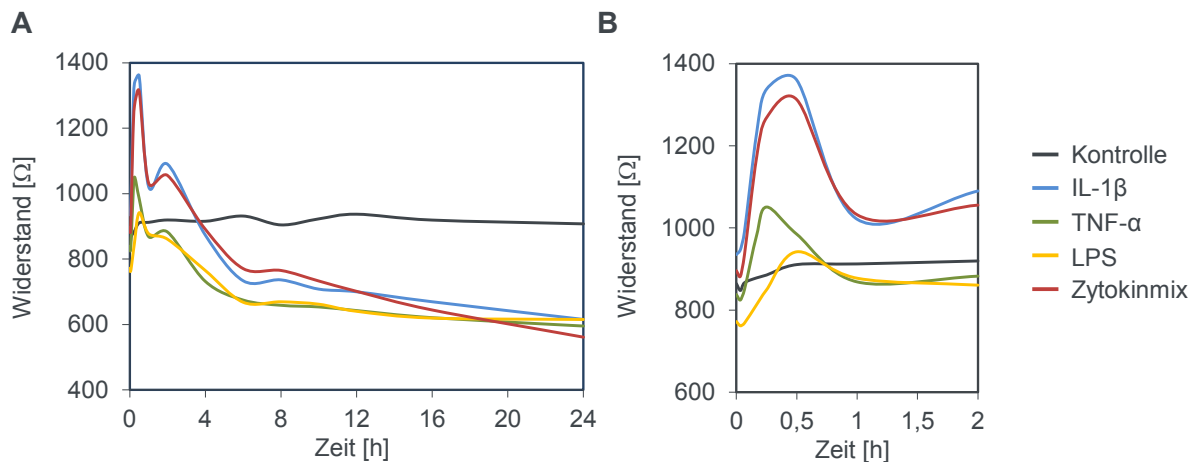


Abbildung 29: Zytokin- und Endotoxin-Behandlung führen zu einer Veränderung der Barrierefunktion von HUVEC. HUVEC wurden auf Goldelektroden ausgesät und nach Ausbilden einer stabilen Barriere mit 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α , 1 μ g/ml LPS oder dem Zytokinmix (50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS) stimuliert. Die ECIS-Messung wurde für 24 Stunden weitergeführt. **A** zeigt den Mittelwert des Verlaufs des Widerstands innerhalb von 24 Stunden nach Stimulierung. **B** zeigt den Mittelwert des Verlaufs des Widerstandes innerhalb von 2 Stunden nach Stimulierung. n=6. Die Ergebnisse der statistischen Prüfung sind im Text aufgeführt.

Abbildung 29 zeigt, dass eine konfluente HUVEC-Schicht unter Ruhebedingungen einen Widerstandswert von 850 bis 950 Ω erreichte. 30 Minuten nach Stimuluszugabe kam es vor allem nach IL-1 β und Zytokinmix zu einem kurzen aber signifikanten Anstieg der Impedanz ($1312 \pm 90 \Omega$ beziehungsweise $1360 \pm 122 \Omega$; Kontrollwert von $911 \pm 50 \Omega$) (Abbildung 29B). Auf diesen Barriereanstieg folgte ein deutlicher Abfall des Widerstands. 24 Stunden nach Stimulierung lagen die Widerstandswerte bei $616 \pm 50 \Omega$ für IL-1 β , $561 \pm 13 \Omega$ für den Zytokinmix, $595 \pm 84 \Omega$ für TNF- α und $615 \pm 78 \Omega$ für LPS, während der Kontrollwert stabil

blieb ($908 \pm 117 \Omega$). Die Erhöhung der Permeabilität war für IL-1 β und den Zytokinmix signifikant ($p < 0,05$, $n=6$). Die Behandlung mit den eingesetzten inflammatorischen Stimuli führte somit zu einer nachweisbaren Erhöhung der Permeabilität der Endothelschicht.

3.3 Proinflammatorische Mediatoren und AMPK-Aktivität in HUVEC

Nachdem HUVEC als geeignetes Zellmodell für proinflammatorische Stimulierungen charakterisiert wurden, sollte nun untersucht werden, ob AMPK in den verwendeten HUVEC durch proinflammatorische Stimuli beeinflusst wird und ob sie mit den inflammatorischen Signalwegen interagiert.

3.3.1 AMPK-Phosphorylierung und -Aktivität nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Kurzzeit-Experimente)

Zunächst wurde geprüft, ob die AMPK-Aktivität durch IL-1 β , TNF- α und/oder LPS verändert wird. Abbildung 30 zeigt, dass eine Zytokinmix-Stimulierung von HUVEC bis zu 3 Stunden weder eine aktivierende T172-Phosphorylierung der katalytischen α -Untereinheit der AMPK noch eine S79-Phosphorylierung des AMPK-Zielmoleküls ACC am bewirkte. Der Zytokinmix führte jedoch nach 30 Minuten zu einer transienten S485-Phosphorylierung der AMPK.

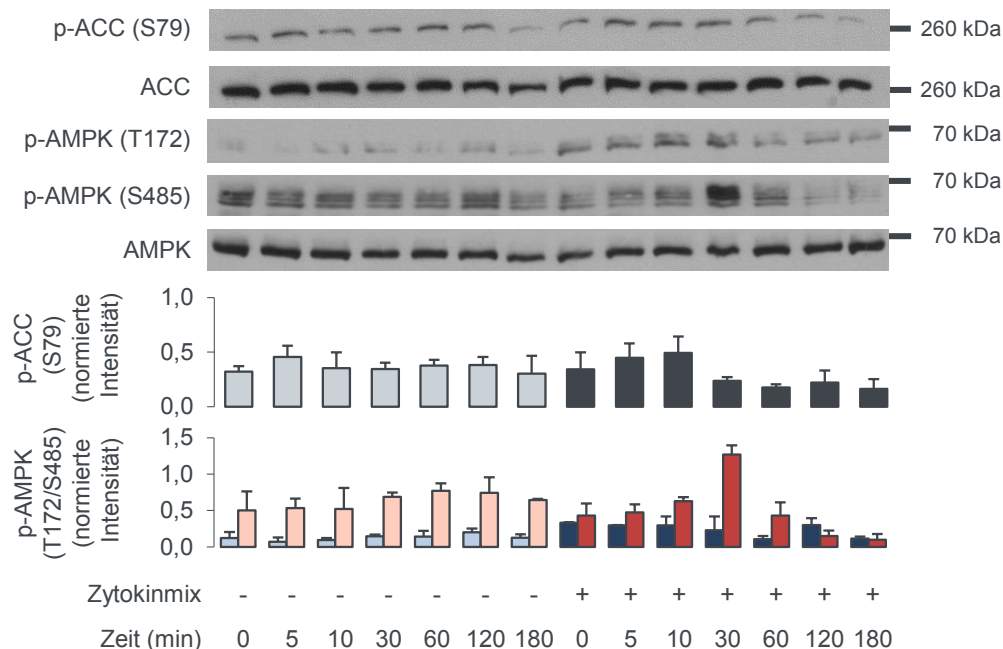
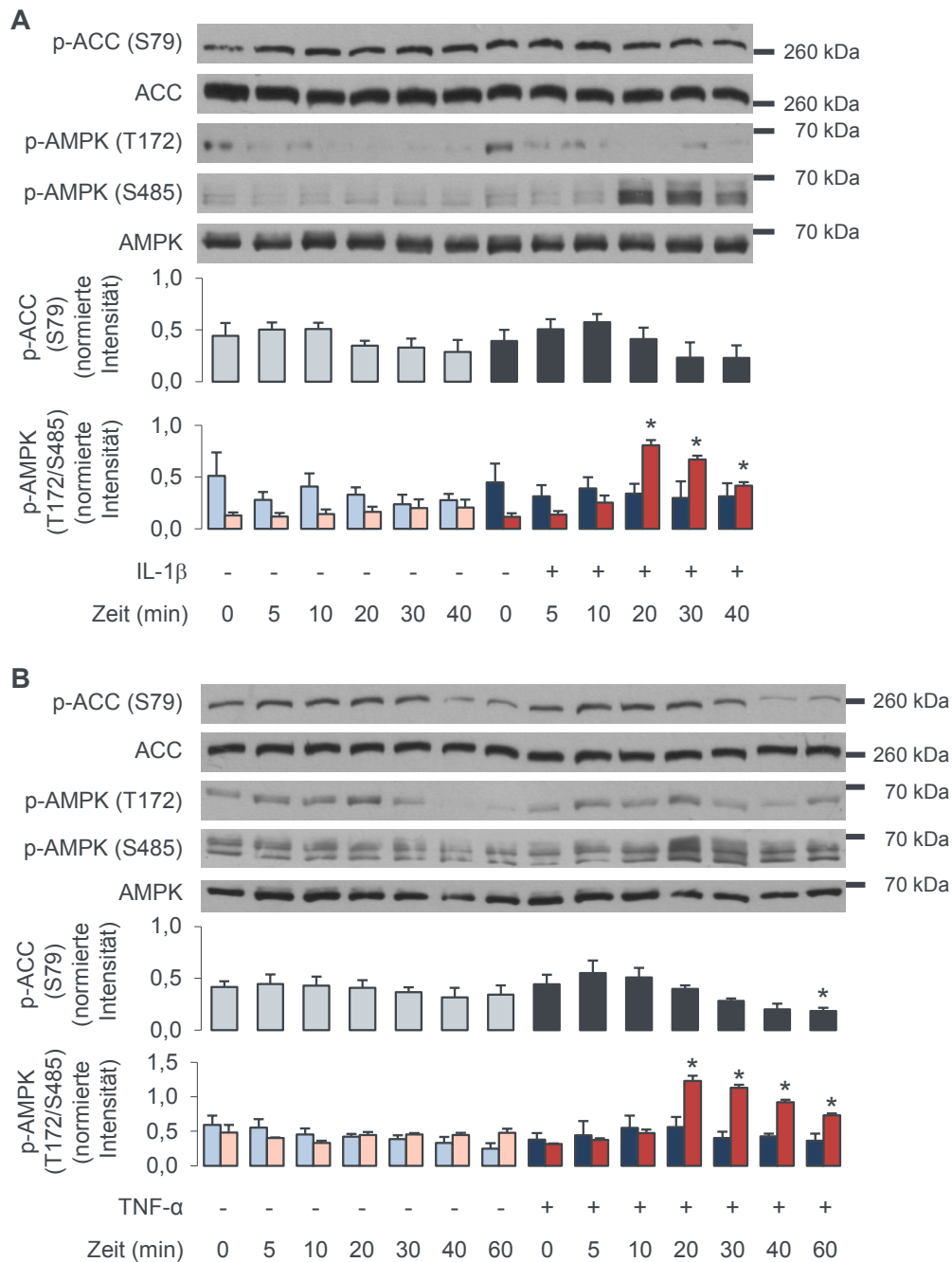


Abbildung 30: Stimulierung mit Zytokinmix bewirkt eine S485-Phosphorylierung der AMPK. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von AMPK und ACC sowie das AMPK- und ACC-Gesamtprotein nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der S79-Phosphorylierung der ACC (grau), der T172-Phosphorylierung der AMPK (blau) sowie der S485-Phosphorylierung der AMPK (rot) von 2 Blots (Mittelwert \pm SEM), $n=2$.

Die Stimulierung mit den einzelnen Substanzen IL-1 β , TNF- α oder LPS hatte ebenso keinen Einfluss auf die T172-Phosphorylierung der AMPK und die S79-Phosphorylierung der ACC (Abbildung 31). Jedoch trat genauso wie nach Stimulierung mit dem Zytokinmix nach IL-1 β - (Abbildung 31A) oder TNF- α -Stimulierung (Abbildung 31B) eine signifikante transiente S485-Phosphorylierung der AMPK mit einem Maximum nach 20 Minuten Stimulierung auf. Diese war nach LPS-Stimulierung nicht nachweisbar (Abbildung 31C).



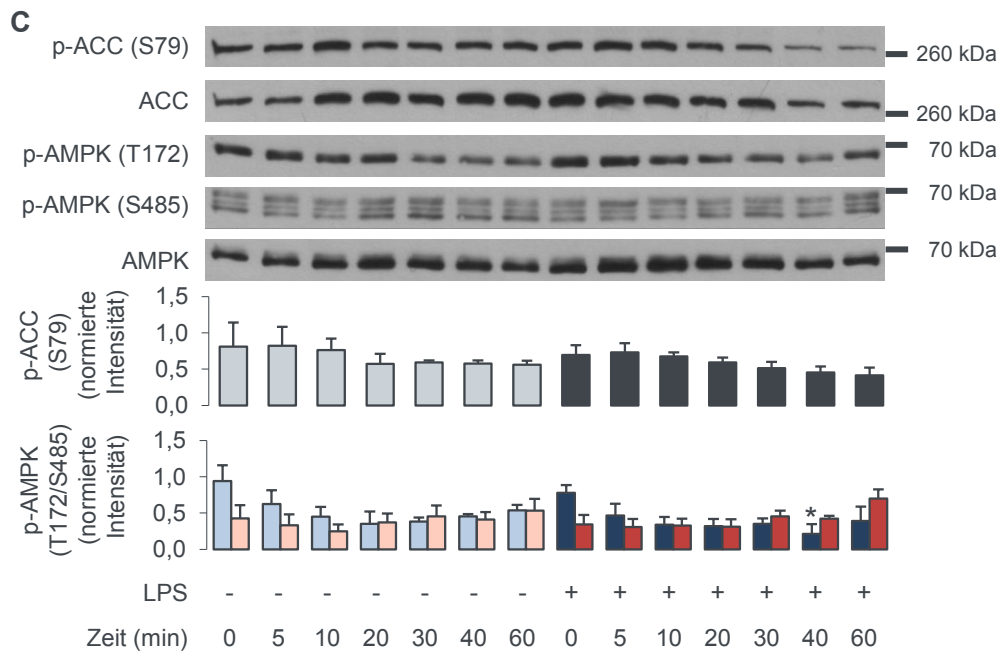


Abbildung 31: IL-1 β und TNF- α bewirken eine S485-Phosphorylierung der AMPK. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α oder 1 μ g/ml LPS stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von AMPK und ACC sowie das AMPK- und ACC-Gesamtprotein nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der S79-Phosphorylierung der ACC (grau), der T172-Phosphorylierung der AMPK (blau) sowie der S485-Phosphorylierung der AMPK (rot) von 3 Blots. (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle), $n=3$.

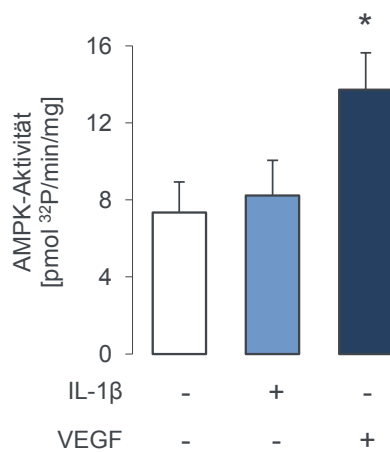


Abbildung 32: IL-1 β -Stimulierung bewirkt keine Veränderung der AMPK-Aktivität. HUVEC wurden für 5 Minuten mit 50 ng/ml VEGF oder für 20 Minuten mit 100 ng/ml IL-1 β stimuliert und anschließend lysiert. Die AMPK β 1-Untereinheit wurde immunpräzipitiert und die Aktivität der AMPK in einem Aktivitätsassay ermittelt. $n=9$ (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle).

Die S485-Phosphorylierung der α -Untereinheit der AMPK wird in der Literatur mit einer Enzym-Hemmung in Verbindung gebracht [120–125]. Um dies zu überprüfen, wurde nach 20-minütiger IL-1 β -Stimulierung der Zellen ein AMPK-Aktivitätsassay mit VEGF als Positivkontrolle durchgeführt. Eine Veränderung der AMPK-Aktivität war jedoch nicht nachweisbar (Abbildung 32).

3.3.2 AMPK-Aktivierbarkeit nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Langzeit-Experimente)

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, ist die *in vitro*-Aktivität der AMPK nach Stimulierung mit proinflammatorischen Stimuli bis zu einer Stunde nicht verändert. Um zu überprüfen, ob längere Einwirkzeiten der Zytokine die basale AMPK-Aktivität oder die Aktivierbarkeit des Enzyms durch physiologische oder pharmakologische Stimuli verändern, wurden Endothelzellen 24 Stunden lang mit Zytokinmix vorinkubiert und dann mit AMPK-Aktivatoren stimuliert.

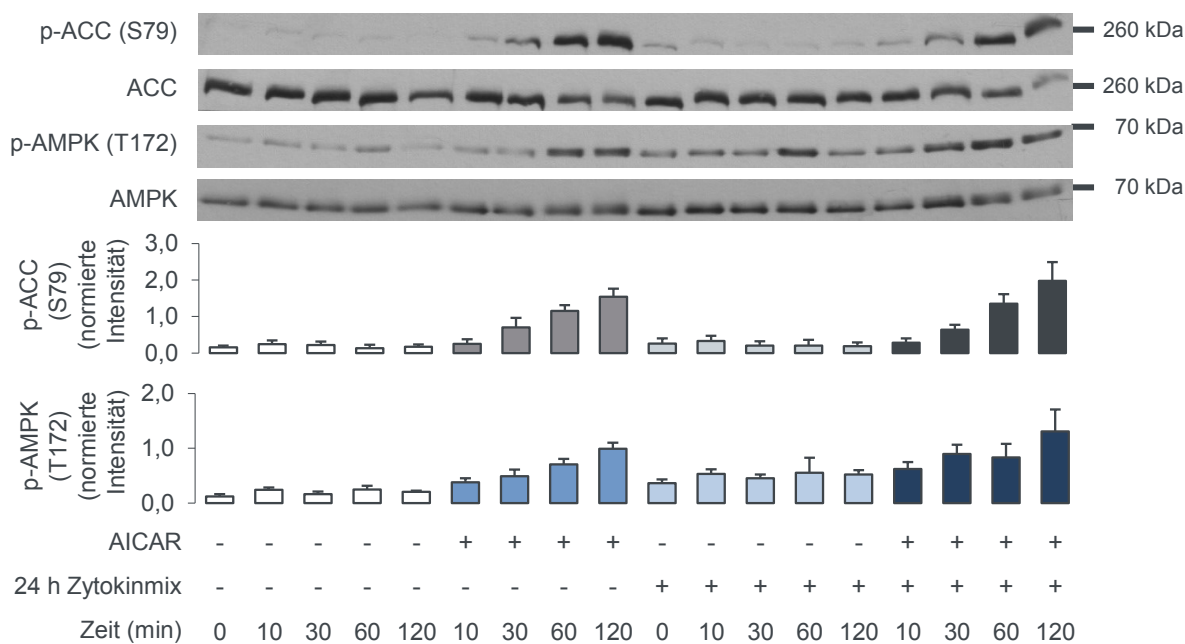
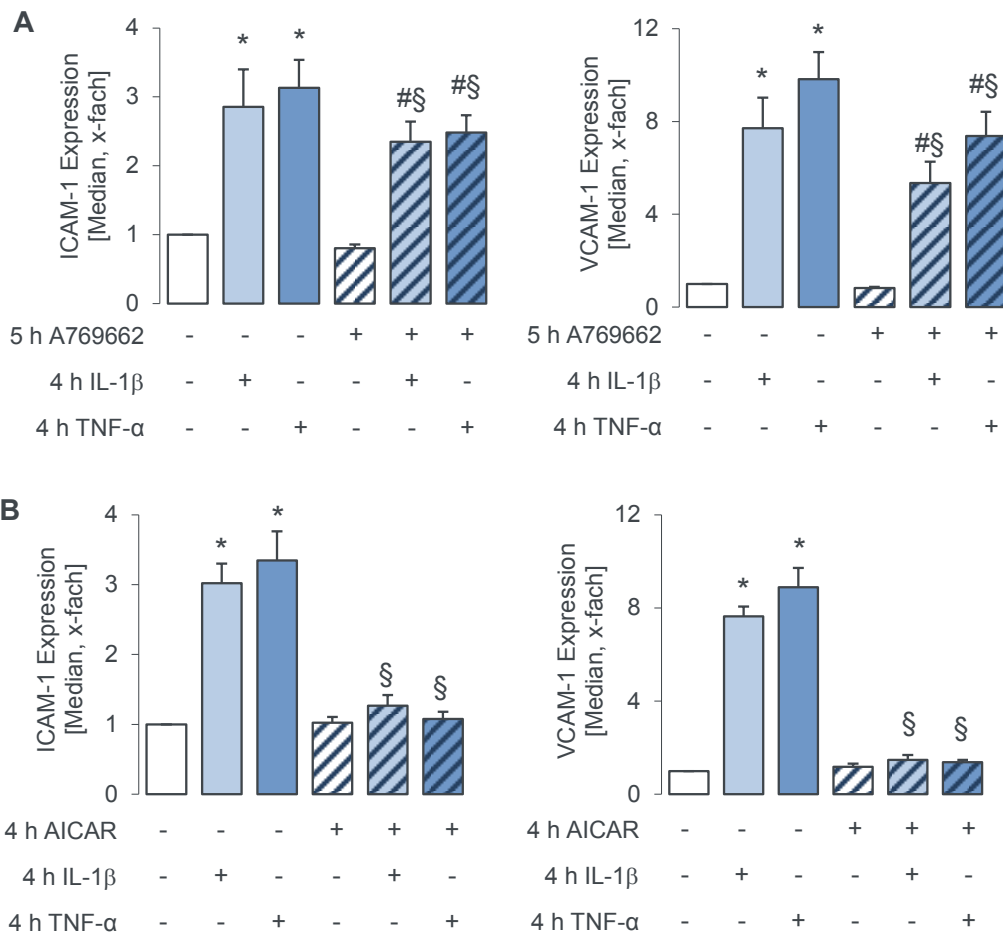


Abbildung 33: Die Stimulierung mit Zytokinmix hat keinen Einfluss auf eine nachfolgende AMPK-Aktivierung. HUVEC wurden für 24 Stunden mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS behandelt. Danach wurden die Zellen zeitabhängig mit 2 mM AICAR stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von ACC und AMPK sowie das ACC- und AMPK-Gesamtprotein nachgewiesen. Die Abbildungen zeigt repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der S79-Phosphorylierung der ACC (grau) und der T172-Phosphorylierung der AMPK (blau). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, n=2.

Abbildung 33 zeigt, dass eine 24-stündige Behandlung von HUVEC mit Zytokinmix zu einer leicht erhöhten T172-Phosphorylierung der AMPK führte, die sich jedoch nicht in einer S79-Phosphorylierung der ACC widerspiegelte. Eine AMPK-Aktivierung durch AICAR wurde durch Zytokinmix-Vorbehandlung nicht verhindert, was auch anhand der S79-Phosphorylierung der ACC zu erkennen war. Versuche mit VEGF als AMPK-Aktivator ergaben vergleichbare Ergebnisse (Daten siehe Anhang 6.2.3, Abbildung S. 45).

3.3.3 Einfluss der AMPK auf Zytokin-induzierte Adhäsionsmolekülexpression

Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine Aktivierung der endothelialen AMPK durch pharmakologische Agonisten die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei nachfolgender Stimulierung mit Zytokinen oder Zytokinmix beeinflusst.



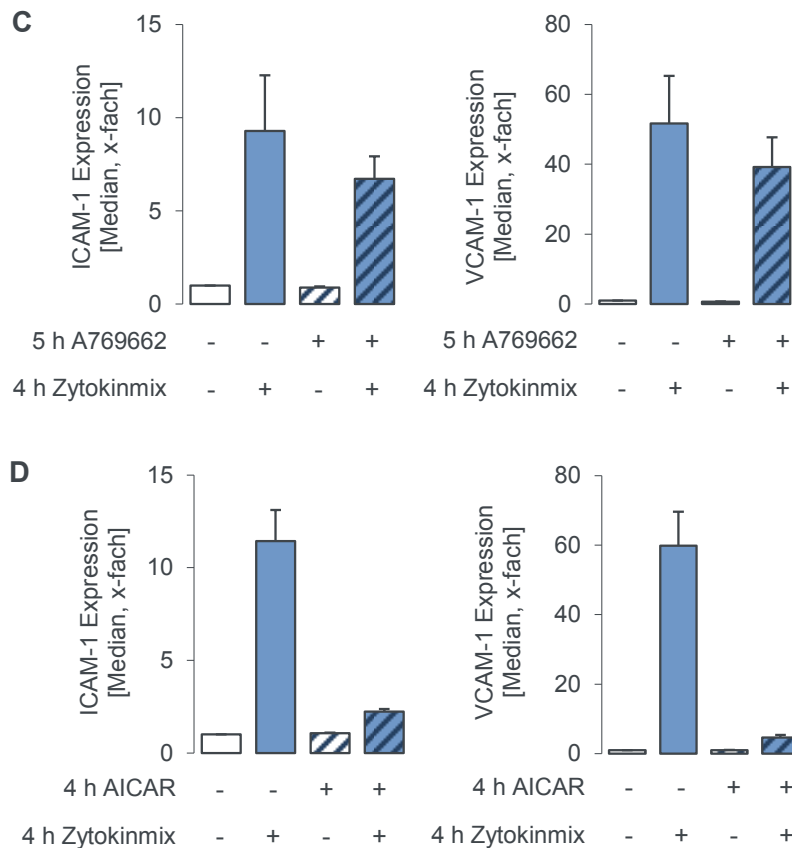


Abbildung 34: Eine Aktivierung der AMPK bewirkt eine verminderte Zytokin-induzierte ICAM-1- und VCAM-1-Expression. HUVEC wurden für 1 Stunde mit 200 μ M A769662 beziehungsweise 2 mM AICAR stimuliert. Es folgte eine Behandlung mit 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α oder einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS für 4 Stunden. Die Zellen wurden anschließend fixiert, trypsinisiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. **A** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für ICAM-1- und VCAM-1 nach A769662 und IL-1 β - oder TNF- α -Stimulierung. n=6, **B** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für ICAM-1- und VCAM-1 nach AICAR- und IL-1 β - oder TNF- α -Stimulierung. n=3 **C** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für ICAM-1- und VCAM-1 nach A769662- und Zytokinmix-Stimulierung. n=2 **D** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für ICAM-1 und VCAM-1 nach AICAR- und Zytokinmix-Stimulierung. n=2 (Mittelwert \pm SEM, * p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zur AICAR/A769662-behandelten Kontrolle).

Nachdem wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben ICAM-1 und VCAM-1 zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Zytokinmix-Stimulierung gut detektierbar waren, wurde dieser Zeitpunkt für die Experimente gewählt. Abbildung 34A und Abbildung 34B zeigen, dass eine A769662- oder AICAR-vermittelte AMPK-Aktivierung zu einer Verminderung der IL-1 β - oder TNF- α -vermittelten Adhäsionsmolekülexpression in HUVEC führte. Dabei hemmte die A769662-Stimulierung die Expression von ICAM-1 um 20 %, die von VCAM-1 um 25-30 %, während die AICAR-Stimulierung eine nahezu komplette Hemmung der Zytokin-vermittelten Induktion beider Adhäsionsmoleküle bewirkte. Experimente mit Zytokinmix zeigten vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 34C und D).

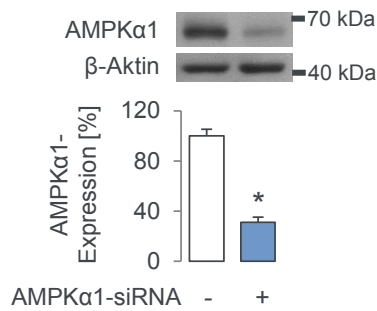


Abbildung 35: AMPKα1-siRNA führt in HUVEC zu einer Herunterregulierung von AMPKα1. HUVEC wurden mit 0,5 µg AMPKα1-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und nach 72 Stunden lysiert. Im Western Blot wurde die Expression von AMPKα1 sowie β-Aktin nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot, sowie die densitometrische Auswertung, n=4, Mittelwert +/-SEM, * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle).

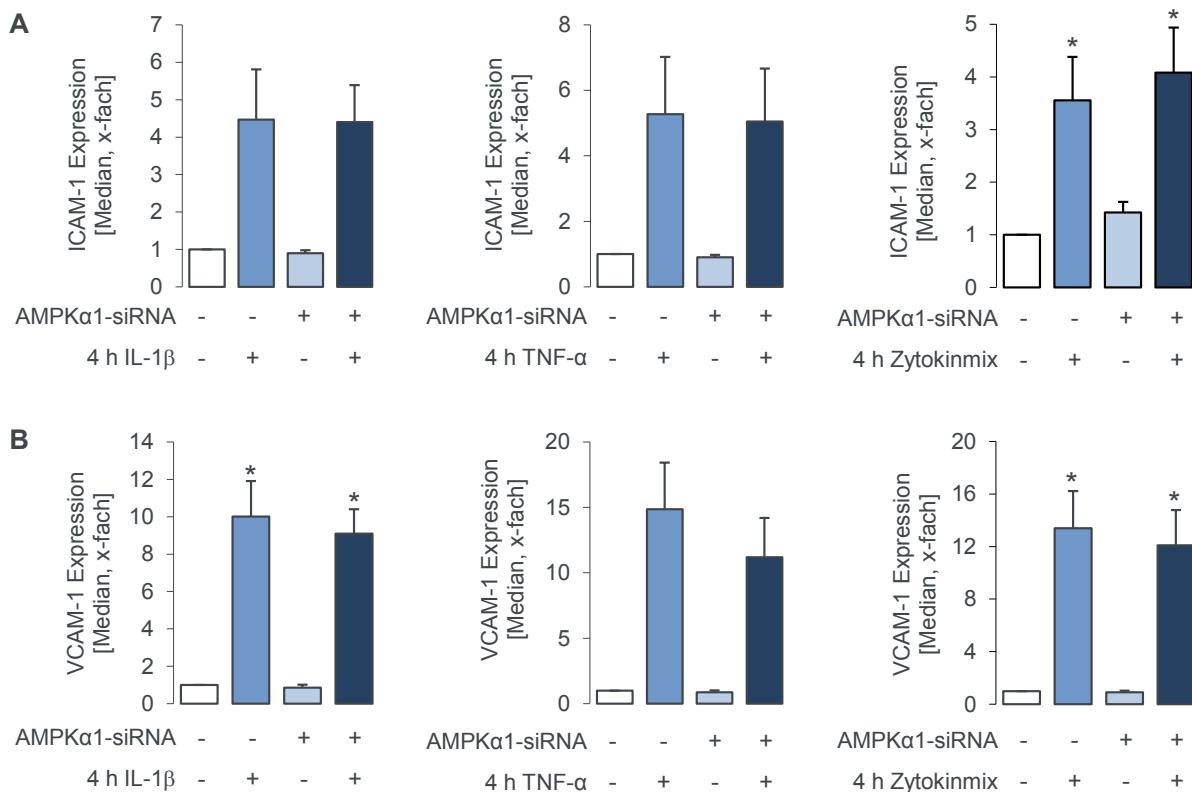
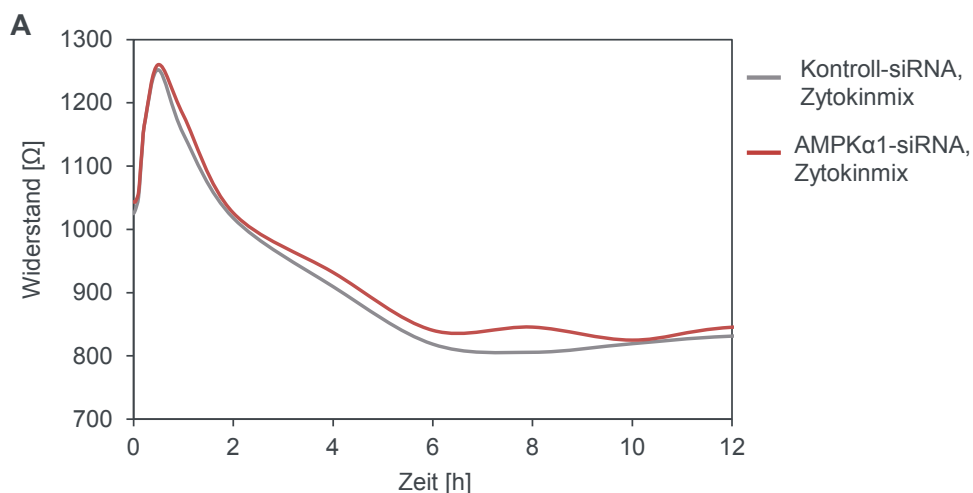


Abbildung 36: Eine Herunterregulierung der katalytischen AMPKα1-Untereinheit bewirkt keine Veränderung der Zytokinmix-induzierten Adhäsionsmolekül-Expression. HUVEC wurden mit 0,5 µg AMPKα1-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden sie für 4 Stunden mit 100 ng/ml IL-1β, 100 ng/ml TNF-α oder einem Mix aus 50 ng/ml IL-1β, 50 ng/ml TNF-α und 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, trypsiniert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. **A** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für ICAM-1, **B** zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für VCAM-1 nach IL-1β-, TNF-α- (n=3) oder Zytokinmix-Stimulierung (n=7) (Mittelwert +/- SEM * p<0,05 im Vergleich zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle).

Als zweiter Zugang zur Aufklärung der Rolle der AMPK wurde die RNAi-Technologie gewählt (Abbildung 35). Die Behandlung von HUVEC mit spezifischer siRNA führte zu einer Herunterregulierung der katalytischen $\alpha 1$ -Untereinheit der AMPK um $68,9 \pm 4,1$ %. Dieser *knockdown* bewirkte jedoch keine signifikante Veränderung der IL-1 β -, TNF- α - oder Zytokinmix-induzierten ICAM-1- oder VCAM-1-Expression (Abbildung 36A und B). Insgesamt kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass die basale AMPK-Aktivität keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hat, während die Aktivierung der AMPK letzterer entgegenwirken kann.

3.3.4 Einfluss der AMPK auf die Zytokin-vermittelte Barrierestörung von HUVEC

Im nächsten Versuch wurde mittels ECIS-Technologie der Einfluss der AMPK auf die Zytokinmix-induzierte Barriereveränderung untersucht. Dazu wurden HUVEC verwendet, in denen die katalytische $\alpha 1$ -Untereinheit der AMPK herunterreguliert war oder in denen AMPK mittels AICAR voraktiviert wurde. Wie in Abbildung 37A zu sehen ist, gibt es keine Unterschiede im Barriereverhalten zwischen Zellen mit depletierter AMPK $\alpha 1$ und Kontrollzellen. 30 Minuten nach Zusatz von Zytokinmix kam es zu einem signifikanten Anstieg des Widerstands um etwa 25 % gefolgt von einer deutlichen Impedanzverminderung. Im Gegensatz zum *knockout* der AMPK beeinflusst aber eine Aktivierung der AMPK mit AICAR die Permeabilitätsveränderung nach Stimulierung mit Zytokinen. Abbildung 37B zeigt, dass die Stimulierung mit AICAR die Zytokin-vermittelte Barrierestörung zeitlich verzögert und die Barriere über einen Zeitraum von etwa 2 Stunden stabilisiert. 4 und 6 Stunden nach Zytokinmix-Zusatz war die endotheliale Barriere in AICAR-behandelten Zellen signifikant höher (1384 ± 110 Ω bzw. 1009 ± 101 Ω) als in Kontrollzellen (1031 ± 43 Ω bzw. 827 ± 35 Ω). ($p < 0,05$, $n=4$).



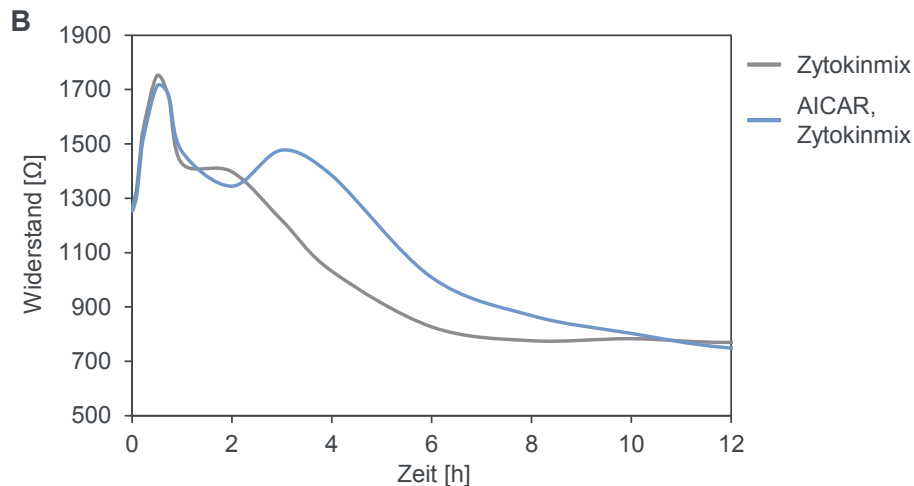


Abbildung 37: Die Aktivierung der AMPK verzögert die Zytokin-vermittelte Barrierestörung. **A** HUVEC wurden mit 0,5 µg AMPKα1-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden sie auf Goldelektroden ausgesät und nach Ausbilden einer stabilen Barriere mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1β, 50 ng/ml TNF-α und 1 µg/ml LPS stimuliert, n=5. **B** HUVEC wurden auf Goldelektroden ausgesät und nach Ausbilden einer stabilen Barriere mit 0,5 mM AICAR vorbehandelt und nach 1 Stunde mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1β, 50 ng/ml TNF-α und 1 µg/ml LPS stimuliert, n=4. Die Abbildung zeigt den Mittelwert des Verlaufs des Widerstands innerhalb von 12 Stunden nach Stimulierung. Die Ergebnisse der statistischen Prüfung sind im Text aufgeführt.

3.3.5 Einfluss von AMPK auf Claudin-5-Expression und -Reduktion nach inflammatorischen Mediatoren

In vivo konnte beobachtet werden, dass die LPS-induzierte Permeabilität zu einer Verminderung des *tight junction*-Proteins Claudin-5 führt. Im folgenden Versuch sollte nun untersucht werden, ob die Zytokinmix-vermittelte Permeabilitätserhöhung in HUVEC mit einer Verringerung der Claudin-5-Expression einhergeht und ob dieser Effekt durch Herunterregulierung von der katalytischen AMPKα1-Untereinheit beeinflusst wird. Abbildung 38 zeigt, dass eine Stimulierung von HUVEC mit Zytokinmix zu einer Verminderung von Claudin-5 führte. Dieser Effekt war in Zellen, in welchen die katalytische AMPKα1-Untereinheit herunterreguliert wurde im Vergleich zu Zytokinmix-behandelten Kontrollzellen verstärkt.

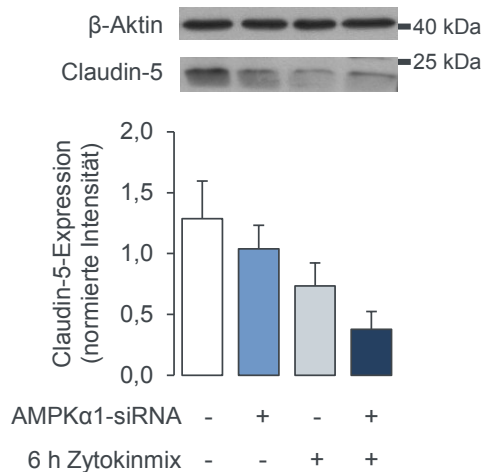


Abbildung 38: Herunterregulierung von AMPK α 1 führt zu einer verstärkten Zytokinmix-vermittelten Verringerung von Claudin-5 nach 6 Stunden. HUVEC wurden mit 0,5 μ g AMPK α 1-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden sie für die angegebene Zeit mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Expression von Claudin-5 sowie β -Aktin nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der Claudin-5-Expression bezogen auf β -Aktin, n=3. (Mittelwert \pm SEM).

3.4 Einfluss von AMPK-Aktivierung auf LPS-induzierte Permeabilitätserhöhung *in vivo*

Nach den Daten der *in-vivo*-Experimente dieser Arbeit führt das Fehlen von AMPK α 1 nach Auslösung einer systemischen Entzündungsreaktion zu einer deutlich verstärkten vaskulären Permeabilität in der Leber. Dies wurde auf einen verstärkten Abbau des *tight junction*-Proteins Claudin-5 zurückgeführt. Die *in-vitro*-Experimente bestätigen den Einfluss des AMPK α 1-Verlusts auf die Claudin-5-Expression. Zudem lassen sie vermuten, dass Stimulierung der AMPK die Expression von Adhäsionsmolekülen negativ reguliert. Im hier dargestellten Experiment wurde nun untersucht, ob eine Aktivierung der AMPK in WT-Mäusen die vaskuläre Barriere *in vivo* stabilisieren kann.

Der *Organ Leakage Assay* wurde 12 Stunden nach LPS-Injektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt in der Leber der WT-Mäuse eine noch deutlichere Erhöhung der vaskulären Permeabilität in der Leber als nach 6 Stunden nachzuweisen war (Abbildung 39A). Um einen hemmenden Effekt einer AMPK-Aktivierung nachweisen zu können, wurde eine 4-stündige Vorbehandlung der Mäuse mit dem AMPK-Agonisten AICAR durchgeführt, bevor LPS injiziert wurde. Abbildung 39B zeigt, dass AICAR den LPS-induzierten Anstieg der vaskulären Permeabilität in der Leber signifikant reduzierte. Daraus ist zu schlussfolgern, dass eine AMPK-Aktivierung stabilisierend auf die endotheliale Barriere wirkt und eine Endotheldysfunktion vermindern kann.

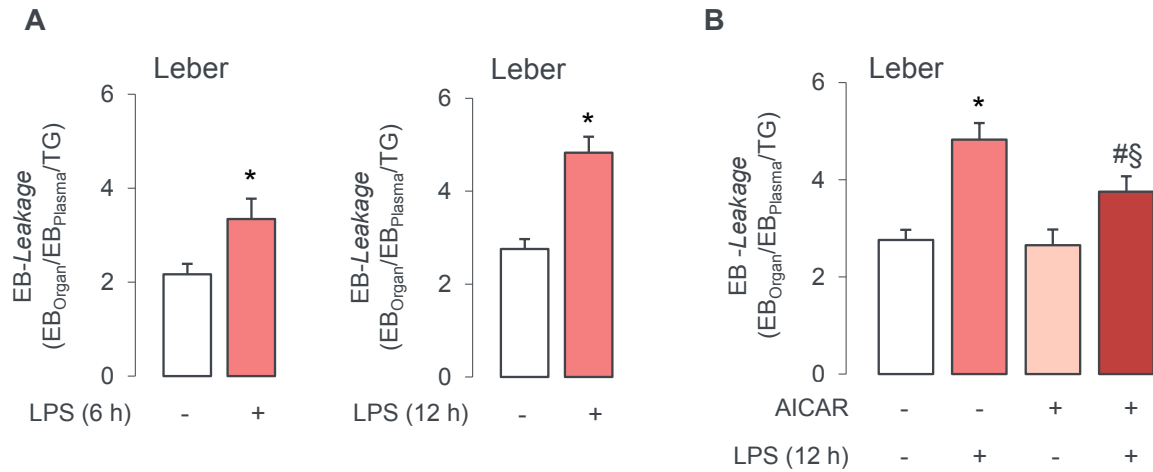


Abbildung 39: AICAR-Behandlung von WT-Mäusen führt zu einer Verminderung der LPS-induzierten Permeabilitätserhöhung in der Leber. **A** WT-Mäusen wurde intraperitoneal 10 µg/g KG LPS beziehungsweise 10 µl/g KG 0,9 % NaCl injiziert und für 6 bzw. 12 Stunden ein *Organ Leakage* Assay durchgeführt. **B** WT-Mäusen wurde intraperitoneal 500 µg/g KG AICAR beziehungsweise 12,5 µl/g KG 0,9 % NaCl injiziert. Nach 4 Stunden erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 10 µg/g KG LPS beziehungsweise 10 µl/g KG 0,9 % NaCl. Anschließend wurde für 12 Stunden ein *Organ Leakage* Assay durchgeführt. **A-B** Der *Evans Blue*-Gehalt der Leber wurde auf Hämoglobingehalt, *Evans Blue*-Gehalt des Plasmas und Trockengewicht der Leber korrigiert **A** Vergleich Leber 6 Stunden (n=12 für beide Gruppen) und 12 Stunden, (WT Kontrolle n=7, WT LPS n=11) **B** Auswertung des Einflusses von AICAR auf die vaskuläre Permeabilität in der Leber (Kontrolle n=7, LPS n=11-12) (Mittelwert +/- SEM, * p<0,05 im Vergleich zur WT Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zur AICAR-behandelten Kontrolle, § p<0,05 im Vergleich zu WT LPS).

4 Diskussion

Sepsis ist ein klinisches Syndrom, welches mit einer systemischen Entzündung einhergeht. Die dabei entstehende mikrovaskuläre Dysfunktion trägt maßgeblich zur Entstehung von septischem Organversagen bei, welches die Schwere des Krankheitsbildes bestimmt und letzten Endes zum Tod führen kann. Die mikrovaskuläre Dysfunktion basiert initial auf Störungen der Endothelfunktion. Studien, deren Ziel es ist, die Entwicklung endothelialer Dysfunktion unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung zu untersuchen und zu beeinflussen, sind daher von großer Bedeutung.

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich vor diesem Hintergrund mit dem als Energiesensor bekannten Enzym AMPK, welchem nach Literaturbefunden auch eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen wird [62,101–104]. Für die Untersuchungen wurden Mäuse oder Endothelzellen verwendet, in denen die katalytische AMPK α 1-Untereinheit genetisch entfernt beziehungsweise herunterreguliert wurde. Für die *in-vivo*-Untersuchungen wurde ein Endotoxämie-Modell gewählt, bei welchem durch eine intraperitoneale LPS-Injektion eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Dieses wird aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse häufig zur Untersuchung der Vorgänge bei einer systemischen Entzündung eingesetzt, ahmt die Vorgänge bei Sepsis jedoch nicht vollständig nach [114,126,127].

Die vorliegenden Daten zeigen, dass AMPK die Ausprägung der systemischen Entzündung wesentlich beeinflusst. Der AMPK α 1-KO führt in weiblichen Mäusen zu einer erhöhten systemischen Entzündung und Mortalität. In AMPK α 1-KO-Mäusen beiderlei Geschlechts wurden zudem im Vergleich zu WT-Zuchtgeschwistern eine verstärkte Störung der vaskulären Barriere in der Leber und eine erhöhte Leberschädigung beobachtet. Die gesteigerte vaskuläre Permeabilität war mit einer leicht verminderten Expression des *tight junction*-Proteins Claudin-5 assoziiert. Die *in-vivo*-Daten konnten zum Teil in Endothelzellkulturen bestätigt werden. Die Ergebnisse lassen auf eine schützende Rolle der AMPK bei der Entstehung einer mikrovaskulären Dysfunktion schließen. In Übereinstimmung damit führte die Behandlung von Mäusen mit dem AMPK-Aktivator AICAR zu einer Verminderung der LPS-induzierten Barrierestörung in der Leber.

4.1 Weibliche AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen nach LPS-Injektion eine verstärkte systemische Entzündung und eine erhöhte Mortalität

LPS führte in der vorgelegten Arbeit bereits 6 Stunden nach intraperitonealer Gabe zur Entwicklung einer systemischen Entzündungsreaktion. Diese war durch den Anstieg verschiedener Zytokine im Plasma (TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-6 und MCP-1) gekennzeichnet. Diese Beobachtungen entsprechen Literaturangaben, nach denen proinflammatorische

Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β zu frühen Zeitpunkten einer systemischen Entzündung im Blut nachweisbar sind [15]. Die systemische Entzündung war in weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen besonders stark ausgeprägt und ihre Plasma-Zytokin-Konzentrationen waren signifikant höher als die weiblicher WT-Mäuse. Zudem waren sie auch höher als die Zytokin-Konzentration im Plasma männlicher AMPK α 1-KO-Mäuse, die im Gegensatz dazu nur geringe Unterschiede zu WT-Männchen zeigten. In Übereinstimmung damit wurde in einer ähnlichen Studie keine unterschiedliche Ausprägung der systemischen Entzündung zwischen männlichen WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen gefunden; Weibchen wurden dabei nicht untersucht [28].

Geschlechtsspezifische Unterschiede waren auch hinsichtlich der LPS-induzierten Mortalität zu beobachten. AMPK α 1-KO-Weibchen entwickelten nach LPS-Injektion im Vergleich zu WT-Weibchen eine signifikant höhere Mortalität während es bei den männlichen WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen keine Unterschiede im Überleben gab. Vermutlich gibt es einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten systemischen Entzündungsreaktion und der Sterblichkeit bei AMPK α 1-KO-Weibchen. Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit zeigen Castanares-Zapatero et al. 24 Stunden nach LPS-Injektion eine höhere Sterblichkeit bei AMPK α 1-KO-Männchen im Vergleich zu WT-Männchen (70 % gegen 7 %) [28]. Das Design dieser Studie unterscheidet sich jedoch hinsichtlich der eingesetzten LPS-Dosis und des Beobachtungszeitraums von der in dieser Arbeit durchgeführten Überlebensstudie, bei welcher mit einer LPS-Dosis von 20 mg/g KG ein etwa 50 %iges Versterben der WT-Mäuse im Beobachtungszeitraum von bis zu 7 Tagen erreicht wurde. Castanares-Zapatero et al. verwendeten zwar eine geringere LPS-Dosis (10 mg/g KG), beobachteten aber schon nach 24 Stunden eine hohe Mortalität der AMPK α 1-KO-Mäusen, was auf ein Versterben durch septischen Schock schließen lässt. Die Unterschiede in der Sterblichkeit sind vermutlich auch auf verschiedene Umgebungsfaktoren zurückzuführen. Zum Beispiel kann die Temperatur, bei der die Mäuse gehalten werden, einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit haben (Daten B. Ndongson-Dongmo) und eine geringere Umgebungstemperatur kann zu einer verstärkten Mortalität beitragen. In diesem Zusammenhang kann auch von Bedeutung sein, ob die Mäuse einzeln in Käfigen gehalten wurden oder, wie in der vorliegenden Arbeit, zu zweit, sodass sie sich gegenseitig wärmen können. Zusätzlich können der allgemeine Gesundheitszustand der Mäuse und zusätzliche Erkrankungen eine Rolle spielen.

In den meisten Arbeitsgruppen werden für vergleichbare Untersuchungen männliche Tiere verwendet, so dass für die höhere Sterblichkeit von AMPK α 1-KO-Weibchen keine Vergleichsdaten aus der Literatur vorliegen. Jedoch gibt es verschiedene Studien, die zeigen, dass weibliche Mäuse im Proestrus-Stadium eine höhere Überlebensrate nach polymikrobieller Sepsis aufweisen als männliche Tiere und in geringerem Maße eine Sepsis als Folge eines Traumas entwickeln [128–130]. Auch in den Versuchen der vorliegenden

Arbeit konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden. Weibliche WT-Mäuse, die sich nach Synchronisierung in der Poestrus-Phase befanden, wiesen eine geringere Mortalität auf als männliche WT-Mäuse (33,3 % gegen 58,3 %), was interessanterweise mit niedrigen TNF- α -Plasmaspiegeln in WT-Weibchen korrelierte. Der AMPK α 1-KO hob den Unterschied in der Mortalität auf und kehrte ihn sogar um. AMPK α 1-KO-Weibchen zeigten eine Mortalität von 83,3 %, die damit höher war als die der WT- oder AMPK α 1-KO-Männchen (58,3 %). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass AMPK α 1 bei weiblichen Mäusen für den Schutz vor systemischer Inflammation mit letalem Ausgang eine besondere Rolle spielt, wobei zu vermuten ist, dass hierbei Hormone eine Rolle spielen. Es ist zum Beispiel bekannt, dass AMPK durch Estrogen aktiviert werden kann [131]. Durch die Kopplung an Estrogen ist der AMPK-Signalweg bei Weibchen vermutlich wichtiger und ein Fehlen der AMPK und somit des Signalwegs führt zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen sowie einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber diesen Stimuli und schließlich zu einer erhöhten Mortalität. Eine über Estrogen aktivierte AMPK könnte über die Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges die Zytokinausschüttung aus Entzündungszellen hemmen oder die Bildung von ROS vermindern [102,109]. So wird in der Literatur beispielsweise beschrieben, dass AMPK die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen hemmt [109]. Makrophagen wiederum spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der LPS-induzierten systemischen Inflammationsantwort [132]. Bei männlichen Tieren könnte dagegen durch die generell niedrigen Estrogenspiegel die systemische Schutzfunktion des AMPK-Signalweges geringer ausfallen.

4.2 AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine erhöhte LPS-induzierte vaskuläre Permeabilität in der Leber

Während in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte LPS-induzierte Mortalität und eine erhöhte systemische Entzündungsreaktion vor allem bei weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen beobachtet wurde, war eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität in der Leber von sowohl weiblichen als auch männlichen AMPK α 1-KO-Mäusen zu detektieren. Das deutet darauf hin, dass die Schutzwirkung der AMPK auf lokaler und systemischer Ebene auf unterschiedlichen Mechanismen beruht.

Die Daten zur endothelialen Barrierefunktion wurden in einem *in-vivo*-Permeabilitätsassay erhoben. Das Prinzip hierbei ist, dass der intravenös injizierte Farbstoff *Evans Blue* an Albumin bindet und damit die Akkumulation des Proteins im Gewebe anzeigen kann [133]. Albumin wird unter Normalbedingungen über transzellulären caveolären Transport durch die Endothelschicht vom Blut in das darunterliegende Gewebe transportiert (vergleiche Abbildung 4). Für den parazellulären Transportweg zwischen Endothelzellen ist Albumin mit

einer Größe von 66 kDa zu groß [40,43,44]. Erst wenn die Endothelschicht zum Beispiel unter inflammatorischen Bedingungen durchlässig wird und sich Lücken bilden, welche auch Makromoleküle passieren lassen, kann Albumin unkontrolliert das Gefäßlumen verlassen und sich im Gewebe anreichern [40,45]. Ist *Evans Blue* an Albumin gebunden, kann diese Anreicherung durch den Nachweis des Farbstoffs detektiert werden.

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass AMPK α 1-KO-Mäuse auf eine LPS-Verabreichung mit einer im Vergleich zu WT-Mäusen höheren vaskulären Permeabilität reagieren. Dies war in Lunge und Niere nur als Tendenz, in der Leber aber sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren signifikant nachweisbar. Die Ursache für die Organspezifität ist gegenwärtig nicht geklärt. Es ist aber zu vermuten, dass die Leber als ein Organ, das sehr früh mit Entzündungsmediatoren in Kontakt kommt, auch früh von endothelialen Veränderungen betroffen ist [134,135]. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass der Effekt der LPS-Gabe nur zum Zeitpunkt nach 6 Stunden ermittelt wurde und daher nicht auszuschließen ist, dass eine deutliche Barrierestörung und ein Effekt des AMPK α 1-KO in Lunge und Niere nach längerer LPS-Wirkung zu sehen ist. Eine erhöhte kardiale vaskuläre Permeabilität wurde beispielsweise in AMPK α 1-KO-Mäusen 24 Stunden nach LPS-Injektion beobachtet [28]. Neben dem Zeitfaktor könnte die endotheliale Heterogenität und die Mikroumgebung in den einzelnen Gefäßbereichen die beobachteten Differenzen erklären.

Beim Endothel der Leberkapillaren, den sogenannten Lebersinusoiden, handelt es sich um fenestriertes diskontinuierliches Endothel, welches im Vergleich zu anderen Kapillargebieten eine erhöhte Durchlässigkeit für Substanzen aufweist [1]. Die Fenestrae stellen Poren dar und wirken als Filter, welcher die bidirektionale Passage von Flüssigkeit, gelösten Substanzen und kleinen Partikeln ermöglicht. Es handelt sich um dynamische Strukturen, deren Anzahl und Durchmesser durch verschiedene Substanzen beeinflusst werden kann [136]. So kann beispielsweise VEGF die Fenestrierung der Sinusoide induzieren [137], während Toxine und inflammatorische Mediatoren die Anzahl der Fenestrierungen im sinusoidalen Leberendothel verringern können [138,139]. Die Fenestrae unterliegen außerdem Kontraktion und Dilatation, wobei Kalzium-erhöhende Signalwege und Umbauvorgänge im Zytoskelett eine Rolle spielen. Ein Anstieg des Durchmessers der Fenestrierungen wurde nach akuter Einwirkung von Endotoxin beschrieben [140,141]. Zusätzlich zum Transport durch Fenestrae haben die Endothelzellen der Lebersinusoide auch die Kapazität zur Endozytose und Transzytose. Die Vorgänge, die in der Leber nach Einwirkungen von proinflammatorischen Mediatoren zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität führen, sind bisher wenig untersucht. Vermutlich spielen hierbei sowohl die Erweiterung des Durchmessers der Fenestrae als auch die Entstehung von interzellulären Lücken durch Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen eine Rolle. Entgegen früherer

Annahmen weisen die Endothelzellen der Lebersinusoide solche interzelluläre Verbindungen auf, welche der Kontrolle des Zytoskeletts unterliegen [142] (siehe Abschnitt 4.4).

Bei einer Entzündung in der Leber sind laut Literatur zunächst Lebermakrophagen – sogenannte Kupffer-Zellen – und die Endothelzellen der Sinusoide die ersten Zellen, die mit LPS in Kontakt kommen und dadurch aktiviert werden [135]. Die LPS-induzierte Reaktion wird über den TLR4-Rezeptor vermittelt und führt zu einer Aktivierung von NF- κ B- und MAPK-Signalwegen [143,144]. Dadurch kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, zur Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Produktion von ROS. ROS können wiederum das Endothel schädigen, was die Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit und die Entstehung von endothelialen Lücken bewirkt [140]. Dieser Prozess wird über eine NF- κ B-vermittelte Aktivierung des Rho-Kinase-Wegs verstärkt, welcher zur Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins und Kontraktion des Zytoskeletts führt [29]. Die Entstehung solcher interzellulärer Lücken im sinusoidalen Endothel wurde beispielsweise auch in einem Endotoxämie-Modell der Maus nachgewiesen und auf die Wirkung des durch LPS induzierten TNF- α zurückgeführt [145]. Die Aktivierung und Lückenbildung des Endothels sind Voraussetzung für die Einwanderung von Neutrophilen in das Lebergewebe, welche die Fenestrae normalerweise nicht passieren können. Da in den Versuchen dieser Arbeit Leukozyteneinwanderung in das Gewebe nachweisbar war (siehe 4.3), ist anzunehmen, dass auch hier Lücken in der Endothelzellschicht entstanden sind.

Zusätzlich kann der Prozess der Apoptose, welcher durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α ausgelöst wird [146], bei der Störung der endothelialen Barriere eine Rolle spielen. Eine Färbung des Endothelmarkers CD31 in Leberschnitten und Western Blots von Leberlysaten in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass das Endothel in der Leber LPS-behandelter Mäuse Schädigungen aufweist. Dabei waren allerdings keine Unterschiede zwischen WT- und AMPK α 1-KO-Mäusen zu detektieren. Zellverlust allein kann daher die erhöhte vaskuläre Permeabilität in den Lebern der AMPK α 1-KO-Mäuse nicht erklären. Mögliche Ursachen für diesen Unterschied werden im Abschnitt 4.4 diskutiert.

4.3 AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine verstärkte Leberschädigung

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die in WT-Mäusen beobachtete LPS-induzierte vaskuläre Dysfunktion in der Leber mit einer hepatischen Entzündungsreaktion einhergeht. Diese wurde anhand von hepatischen TNF- und IL-1 β -Spiegeln und einer signifikanten Einwanderung von neutrophilen Leukozyten in das Lebergewebe verifiziert. Im Gegensatz zu vielen anderen Organen, in denen Neutrophile im Bereich der postkapillären Venolen in das Gewebe transmigrieren, scheint die Extravasation von Leukozyten in den Sinusoiden eine

besondere Bedeutung für die Leberschädigung zu haben [147]. Nach Literaturangaben werden Leukozyten während einer Endotoxämie durch Aktivierung von TLR4 an sinusoidalen Endothelzellen in der Leber rekrutiert und über adhäsive Interaktion zwischen CD44, einem Oberflächen-Glykoprotein der Neutrophilen, und endotheliale Hyaluronan arretiert [144]. Daneben wird beschrieben, dass das *vascular adhesion protein 1* (VAP-1) Interaktionen zwischen beiden Zelltypen vermittelt [148,149] und die durch Endotoxämie induzierte Hochregulierung von ICAM-1 in Lebersinusoiden und auch in Hepatozyten für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich ist [148,150,151]. Nach Einwanderung der Neutrophilen in das Parenchym und nachfolgender Aktivierung kommt es zum Zweck der Eliminierung von Pathogenen zur Degranulation und Freisetzung zytotoxischer Moleküle und zur Bildung von ROS, die gleichzeitig zu einer Schädigung des Lebergewebes führen können [126,150,152]. Eine frühe hepatozelluläre Schädigung war anhand der Erhöhung der Transaminasen ALT und AST im Plasma der LPS-behandelten Mäuse nachweisbar. Der Anstieg der AST könnte zusätzlich auch auf eine Schädigung des Herzens deuten [153], während die gleichzeitig gemessenen erhöhten LDH-Werte eine allgemeine Zellschädigung nachweisen. Die hepatozelluläre Schädigung war unter den hier untersuchten Bedingungen jedoch morphologisch nicht sichtbar, wie der Vergleich der HE-Färbungen des Lebergewebes ergab. Das kann an dem relativ frühen Zeitpunkt der Untersuchungen 6 Stunden nach LPS-Verabreichung liegen. Insgesamt bestätigen die Daten dieser Arbeit das Auftreten einer frühen Leberschädigung nach LPS-Injektion, wie es von Recknagel et al. bereits in Ratten beschrieben wurde [126].

AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen nach LPS-Injektion trotz der deutlich stärkeren Erhöhung der vaskulären Permeabilität nur eine gering verstärkte Entzündungsreaktion gegenüber WT-Mäusen. In der Leber von männlichen und weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen waren leicht erhöhte TNF- und IL-1 β -Spiegel und ein Trend zu vermehrter Leukozyteneinwanderung nach LPS-Gabe nachzuweisen. Die verstärkte LPS-induzierte vaskuläre Permeabilität in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen scheint daher die Einwanderung neutrophiler Leukozyten nicht automatisch zu verstärken. Allerdings muss eine erhöhte Permeabilität auch nicht zwangsläufig eine erhöhte Leukozytenmigration zur Folge haben, da letztere nicht nur Lücken im Endothel, sondern auch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen erfordert. Oftmals sind laut Literatur Bereiche, in denen die Barriere des Endothels gestört ist, nicht die Bereiche, in denen sich Leukozyten vermehrt ansammeln [154]. Der *knockdown* von AMPK α 1 hatte in den *in-vitro*-Experimenten kaum einen Einfluss auf die Zytokin-induzierte Expression von ICAM-1, so dass zu erwarten war, dass die durch endotheliale Adhäsionsmoleküle vermittelte Leukozytenmigration *in vivo* wenig beeinflusst ist (siehe Kapitel 3.3.3).

Trotz der nur tendenziell erhöhten entzündlichen Reaktion in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen konnte im Vergleich zu WT-Mäusen anhand der deutlich stärkeren Erhöhung der Transaminasen im Plasma, vor allem der ALT, eine höhere LPS-vermittelte hepatozelluläre Schädigung festgestellt werden. Auch LDH, ein Parameter für zelluläre Schädigungsreaktionen, war in AMPK α 1-KO-Mäusen signifikant stärker erhöht. Bei der Messung der Leberparameter gab es mit Ausnahme der AST, die nur bei AMPK α 1-KO-Weibchen höher war, keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, was mit den Beobachtungen zum Einfluss der AMPK auf die Barrierefunktion übereinstimmt. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass in AMPK α 1-KO-Mäusen entweder die eingewanderten Neutrophilen mehr zytotoxische Moleküle und ROS freisetzen und so zur verstärkten Leberzellschädigung führen oder dass die verstärkte Leberschädigung nicht ausschließlich durch Neutrophile vermittelt wird. Vermutlich spielen andere Faktoren, wie zum Beispiel eine Minderversorgung des Gewebes durch Störungen der Mikrozirkulation eine Rolle. Zudem kann ein Effekt auf die Einwanderung und/oder Aktivierung anderer Entzündungszellen nicht ausgeschlossen werden.

4.4 AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen eine stärkere Verminderung der Claudin-5-Expression nach LPS

Ein Hauptergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis der erhöhten vaskulären Permeabilität in der Leber von AMPK α 1-KO-Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion. Wie in 4.2 diskutiert, kann die erhöhte Durchlässigkeit der Endothelschicht nach Einwirkung inflammatorischer Stimuli über verschiedene Mechanismen wie erhöhte Transzytose, Absterben von Endothelzellen und besonders auch die Bildung interzellulärer Zwischenräume erklärt werden. Interzelluläre Lücken können zum Beispiel entstehen, indem eine Kontraktion des Zytoskeletts eine Veränderung und Destabilisierung der *tight junctions* bewirkt [28–30,155–160].

Tight junctions kontrollieren primär den parazellulären Flux von Wasser, Ionen und kleinen Molekülen durch die Endothelschicht. Im Endothel ist besonders das *tight junction*-Protein Claudin-5 für die Barrierefunktion verantwortlich [161] und es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Expression von Claudin-5 die Stärke der *tight junctions* im Endothel bestimmt [162]. Ein Mangel an Claudin-5 reicht aus, um *tight junctions* aufzulösen; andere Proteine wie zum Beispiel Occludin sind weniger von Bedeutung [161]. Nitta et al. konnten anhand von Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke in Claudin-5-KO-Mäusen feststellen, dass Claudin-5 vor allem die Barriere für kleine Moleküle kontrolliert. So sind die Mäuse zwar lebensfähig, sterben dann aber schnell aufgrund der Barrierestörung der Blut-Hirn-Schranke, die die Permeation von Proteinen bis zu einer Größe von 800 kDa erlaubt [163]. Nach

Untersuchungen von Geraud et al. ist Claudin-5 auch in den Lebersinusoiden exprimiert [142]. Die hohe Durchlässigkeit des Leberendothels ließ ursprünglich vermuten, dass die Zellen über lockerere Verbindungen wie Adhäsionsverbindungen im Kontakt stehen. Geraud et al. konnten jedoch zeigen, dass in humanen Lebersinusoiden Proteine der Adhäsionsverbindungen wie VE-Cadherin, α -, β -, und p120-Catenin sowie Plakoglobin mit *tight junction*-Proteinen wie Claudin-5, Occludin, ZO-1 und ZO-2 kolokalisiert sind. Die interagierenden Proteine bilden einen Mischtyp interzellulärer Verbindungen aus, der für die Kontrolle des parazellulären Transports in den Lebersinusoiden verantwortlich ist [142].

Übereinstimmend mit den Befunden von Geraud et al. konnte in der vorliegenden Arbeit in Immunfluoreszenz-Färbungen eine deutliche und ebenmäßige Expression von Claudin-5 entlang der Lebersinusoide nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die Färbung in LPS-behandelten Tieren Unregelmäßigkeiten aufwies, was auf einen LPS-induzierten Verlust von Claudin-5 und eine Lockerung der interzellulären Verbindungen hindeutete. Auch in Western Blot-Analysen von Leberlysaten war nach LPS-Behandlung der Tiere eine verminderte Expression von Claudin-5 nachweisbar. Interessanterweise waren die beobachteten Claudin-5-Veränderungen in LPS-behandelten AMPK α 1-KO-Mäusen stärker ausgeprägt, obwohl dies bei der gegenwärtig untersuchten Anzahl der Tiere statistisch nicht zu sichern war. Trotzdem lassen die Daten vermuten, dass die hier beobachtete barriestabilisierende Wirkung von AMPK α 1 über eine Beeinflussung von Claudin-5 reguliert wird. Auch andere Studien kamen zu der Schlussfolgerung, dass AMPK eine barriestabilisierende Wirkung durch Beeinflussung von *tight junctions* und Zytoskelett-Regulation hat. Castanares-Zapatero et al. beschreiben beispielsweise eine Reduktion des *tight junction*-Proteins ZO-1 in den Gefäßen des Herzens von AMPK α 1-KO-Mäusen nach LPS-Injektion [28]. Aus Studien in *Madin-Darby canine kidney*-Zellen ist bekannt, dass AMPK die Bildung von *tight junctions* unterstützt [164,165] und Creighton et al. zeigten, dass AMPK α 1 für die Barrierefunktion in mikrovaskulären Gefäßen der Lunge von Bedeutung ist [166]. Darüber hinaus kann die AMPK auch Regulatoren des Zytoskeletts wie das *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) phosphorylieren [167,168], sodass vermutlich mehrere Mechanismen zu ihrer barriestabilisierenden Wirkung beitragen. Der schützende Einfluss der AMPK auf das Zytoskelett spielt möglicherweise schon basal eine Rolle und könnte erklären, warum die basale Permeabilität in den Lebern weiblicher AMPK α 1-KO-Mäuse erhöht war, obwohl hier keine Veränderungen der Claudin-5-Expression nachzuweisen war. Insgesamt wird hier mit dem Effekt des AMPK α 1-KO auf die Claudin-5-Expression in Endothelzellen ein neuer Weg der Barriereprotektion beschrieben, der in weiteren Studien bestätigt werden muss.

Die Frage, wie die Expression von Claudin-5 in An- oder Abwesenheit von AMPK α 1 durch LPS und die dadurch initiierten inflammatorischen Veränderungen reguliert wird, bleibt noch

offen. Die Daten der Western Blot-Analyse weisen auf einen Abbau – eventuell nach Auflösung der *tight junctions* – hin. Es ist jedoch nicht klar, ob es dabei zu einem vermehrten extrazellulären Abbau durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs), wie Chiu et al. ihn beschreiben [169] oder zu einer Internalisierung mit anschließendem intrazellulären Abbau des Proteins kommt. Claudin-5 hat eine relativ kurze Halbwertszeit von 70 min [170]. Möglicherweise vermitteln Entzündungsmediatoren daher auch eine verminderte Expression, ohne dass der Abbau des Proteins wesentlich beeinflusst wird. Weitere Aspekte der Regulation der Claudin-5-Expression werden in 4.9 diskutiert.

4.5 HUVEC sind als Modell zur Untersuchung der Regulation inflammatorischer Prozesse geeignet

Zur Charakterisierung der Beeinflussung der AMPK durch inflammatorische Zytokine und der Rolle der AMPK als Regulator einer Entzündungsantwort wurden in der vorliegenden Arbeit *in-vitro*-Studien in HUVEC durchgeführt. Verschiedene Experimente hatten davor gezeigt, dass HUVEC ein geeignetes Modell für diese Untersuchungen darstellen. So führte die Stimulierung von HUVEC mit den proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-1 β und LPS in Übereinstimmung mit Literaturdaten zu einer transienten Aktivierung von ERK1/2 und p38, zwei Kinasen, die inflammatorische Prozesse vermitteln [17,18]. Des Weiteren konnte in HUVEC, ebenfalls in Einklang mit bereits publizierten Arbeiten, eine lang anhaltende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, einem der wichtigsten Mediatoren einer Entzündungsantwort, nachgewiesen werden [19–22]. Ebenso entsprechen die mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten zur zeitabhängigen Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli den Literaturbefunden [26,27]. Letzteres gilt auch für die mittels ECIS-Messung detektierte Barrierestörung der HUVEC-Monolayer nach Stimulierung mit Zytokinen und LPS [5,31–33].

4.6 Proinflammatorische Mediatoren verändern das Phosphorylierungsmuster der AMPK

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine zeitabhängige Stimulierung von HUVEC mit proinflammatorischen Stimuli das Phosphorylierungsmuster der AMPK verändert. Dabei war nach alleinigem oder kombiniertem Zusatz von TNF- α , IL-1 β und LPS bis zu 3 Stunden die aktivierende T172-Phosphorylierung der AMPK unverändert. Die S485-Phosphorylierung der AMPK stieg im Gegensatz dazu sowohl nach Stimulierung mit Zytokinmix als auch mit TNF- α und IL-1 β allein signifikant an.

Der Einfluss von Zytokinen auf die AMPK wurde bisher in Makrophagen, Muskelzellen und Endothelzellen untersucht. So konnten Sag et al. zeigen, dass in Makrophagen eine Stimulierung mit LPS zu einer Hemmung der T172-Phosphorylierung der AMPK führt, während antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 AMPK aktivieren [109]. Ebenso wurde für L6-Muskelzellen eine TNF- α -induzierte Hemmung der T172-Phosphorylierung [110] und für humane pulmonale arterielle Endothelzellen eine LPS-induzierte Hemmung der T172-Phosphorylierung beschrieben [171]. Dabei wurden zumeist längere Inkubationszeiten (bis zu 8 Stunden) als in den hier durchgeführten Versuchen untersucht. Für eine Veränderung der T172-Phosphorylierung zu frühen Zeitpunkten, wie sie bei den Versuchen dieser Arbeit untersucht wurden, existieren keine vergleichbaren Literaturdaten. Interessanterweise gibt es jedoch Literaturhinweise darauf, dass Zytokine AMPK nicht hemmen sondern sogar stimulieren können. So wurde TAK1, welche durch TNF- α oder IL-1 β aktiviert werden kann, als eine AMPK-aktivierende Kinase identifiziert [73], die eine T172-Phosphorylierung bewirkt. Diese Vorgänge wurden auch in Endothelzellen beschrieben [172]. Unter den Bedingungen der Versuche dieser Arbeit konnte bis zu 3 Stunden nach Stimulierung weder ein Anstieg noch eine Verminderung der T172-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Lediglich nach einer separat durchgeführten Langzeit-Stimulierung mit Zytokinmix war eine leicht erhöhte T172-Phosphorylierung zu beobachten, die jedoch nicht zu einer Veränderung der Phosphorylierung der ACC, eines gut charakterisierten Zielproteins der AMPK, führte und deren Relevanz daher fraglich bleibt.

Die Phosphorylierung der AMPK am Serinrest 485 wird in der Literatur mit einer inhibitorischen Wirkung in Verbindung gebracht [120–125]. Sie wurde als Reaktion auf Stimuli wie Insulin, Prostaglandin E₂, Leptin und Hepatitis C-Virus beobachtet und auf die Wirkung von Proteinkinase A oder Proteinkinase B (PKB/Akt) zurückgeführt. Nach Zytokinstimulierung wurde sie bisher nicht untersucht. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TNF- α und IL-1 β nicht aber LPS eine S485-Phosphorylierung hervorrufen. Die unterschiedliche Wirkung kann mit den distinkten Signalwegen zusammenhängen, die durch diese Stimuli initiiert werden. Die S485-Phosphorylierung soll zur direkten Hemmung der AMPK führen [121,124,125] und/oder die nachfolgende T172-Phosphorylierung verhindern [122]. Unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen war zu sehen, dass es parallel zur S485-Phosphorylierung zu einem leichten Abfall der ACC-Phosphorylierung kam. Dies könnte auf eine verminderte AMPK-Aktivität hinweisen, allerdings waren hier nur Tendenzen zu beobachten. Im durchgeführten *in-vitro*-Aktivitätsassay konnte jedoch keine Hemmung der enzymatischen Aktivität der AMPK nachgewiesen werden, wobei nicht auszuschließen ist, dass das auf nicht-optimalen methodischen Bedingungen beruht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in AMPK β 1-Immunpräzipitaten anhand der Phosphorylierung eines synthetischen Substrates. Faktoren, wie Translokation, Substratbindung oder

Interaktion mit anderen Proteinen, die alle in der Umgebung der Zelle durch die S485-Phosphorylierung beeinflusst werden könnten, werden hier also nicht erfasst. Es besteht daher die Möglichkeit, dass unter physiologischen Bedingungen, die in der Zelle vorliegen, eine Zytokinstimulierung trotzdem zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt. Dies muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

Eine Zytokinbehandlung scheint nicht die Responsivität der AMPK auf bekannte Aktivatoren zu verändern, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. So beeinträchtigte eine Langzeitstimulierung von HUVEC mit Zytokinmix weder eine nachfolgende VEGF- oder AICAR-vermittelte aktivierende T172-Phosphorylierung der AMPK noch eine damit verbundene Phosphorylierung ihres Substrats ACC. Eine Vorbehandlung von HUVEC mit Zytokinmix hat also keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der AMPK. Im Gegensatz dazu berichten Sag et al., dass eine Langzeitvorbehandlung mit TNF- α in L6-Muskelzellen zu einer Reduktion der anschließend durch AICAR induzierten T172-Phosphorylierung der AMPK führte [109]. Es ist möglich, dass AMPK zelltypspezifisch auf inflammatorische Stimuli reagiert. Insgesamt scheinen proinflammatorische Stimuli nach den hier durchgeführten Untersuchungen die Aktivität der AMPK kaum zu verändern, obwohl deutliche Unterschiede im Phosphorylierungsmuster auftreten. Die Bedeutung dieser Beobachtung muss in weiterführenden Experimenten aufgeklärt werden.

4.7 Eine Aktivierung der AMPK bewirkt eine Verminderung der Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen *in vitro*

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine pharmakologische Aktivierung der AMPK in HUVEC durch AICAR oder A769662 zu einer signifikanten Verminderung der Zytokin-induzierten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 führt, ähnlich, wie sie in der Literatur nach AMPK-Stimulierung bereits beschrieben wurde [105–107,173]. Der Effekt war nach Einsatz von AICAR stärker ausgeprägt, was daran liegen kann, dass diese Substanz zusätzlich über andere AMP-abhängige Signalwege wirken kann [64]. Der Einfluss der AMPK-Aktivierung auf die ICAM-1- und VCAM-1-Expression beruht vermutlich auf einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Zum einen ist bekannt, dass die Promotoren von ICAM-1 und VCAM-1 eine NF- κ B-Bindestelle aufweisen [18,174] und die Expression der Moleküle nach Zytokinstimulierung durch NF- κ B vermittelt wird. Zum anderen wurde eine NF- κ B-Hemmung nach AMPK-Aktivierung bereits beschrieben [62,79,99,102–104,109,175,176]. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist jedoch noch nicht aufgeklärt [106].

Bei NF- κ B handelt es sich um eine Familie von Proteinen, welche Homo- und Heterodimere ausbilden und die Expression inflammatorischer Proteine regulieren. NF- κ B kann auf verschiedene Weisen aktiviert werden, wobei nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und LPS

der klassische Weg [177] die wichtigste Rolle spielt (Abbildung 40A). Hierbei kommt es zu einer Aktivierung des häufigsten NF- κ B-Heterodimers, das aus den Untereinheiten p65 und p50 besteht [21,178,179]. Dieses Heterodimer ist unter Ruhebedingungen an den Inhibitor von κ B (I κ B) gebunden und liegt in inaktiver Form im Zytosol der Zelle vor. Nach Aktivierung proinflammatorischer Signalwege wird der Inhibitor über den I κ B-Kinase (IKK)-Komplex, bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ , phosphoryliert. Daraufhin wird I κ B ubiquitinyliert und abgebaut, sodass NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern transloziert, aktiviert dort die Gentranskription proinflammatorischer Mediatoren [177,178,180] und führt so zur Expression von Adhäsionsmolekülen oder proinflammatorischen Zytokinen. Zur maximalen Aktivierung des Transkriptionsfaktors sind verschiedene Phosphorylierungen der p65-Untereinheit notwendig [177,181,182]. Dazu gehört zum Beispiel die Phosphorylierung an S276, die durch Proteinkinase Ac oder die Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase 1/2 vermittelt wird und die Bindung des Coaktivators *cAMP-response element-binding* (CREB)-*binding protein* (CBP)/p300 fördert [177,180–182]. Zudem wird die NF- κ B-Aktivität über eine Acetylierung an verschiedenen Aminosäureresten reguliert [183].

Vermutlich beruht die Hemmung von NF- κ B durch AMPK nicht auf einer direkten Phosphorylierung von p65 oder anderen Untereinheiten [99], sondern auf der Phosphorylierung von weiteren Proteinen, die wiederum NF- κ B regulieren können. So kann zum Beispiel Sirtuin1, eine Histondeacetylase, die über einen AMPK-vermittelten Anstieg von NAD⁺ aktiviert wird, eine inhibierende Deacetylierung von NF- κ B vermitteln [99,176]. Dieser Mechanismus wird vor allem für die chronische Entzündung bei Adipositas diskutiert. Ein weiterer Faktor, der durch AMPK beeinflusst werden kann, ist der Coaktivator CBP/p300 [102]. Dabei handelt es sich um eine Histonacetyltransferase, welche die NF- κ B-Untereinheit p65 am Lysinrest 221 (K221) acetyliert und dadurch aktiviert [179]. AMPK kann p300 durch Phosphorylierung am S89-Rest inhibieren, sodass die durch p300 vermittelte Aktivierung von p65 verhindert wird (Abbildung 40B) [79,96]. Insgesamt beeinflusst der Acetylierungszustand an verschiedenen Lysinresten von p65 sowohl die DNA-Bindung als auch die Transkriptionsaktivität [179]. Die Hemmung von p300 könnte somit einen indirekten Mechanismus darstellen, über den AMPK NF- κ B inhibieren und die Adhäsionsmolekülexpression nach Zytokinstimulierung vermindern kann.

Obwohl AMPK-Aktivatoren zu einer klaren Hemmung der durch proinflammatorische Stimuli induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen führten, hatte die Herunterregulierung der AMPK α 1 in Endothelzellen keinen Einfluss auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nach Stimulierung mit Zytokinen und/oder LPS. Diese Daten lassen vermuten, dass die basal vorliegende Aktivität der AMPK die Adhäsivität des Endothels kaum beeinflusst und

erst eine Aktivierung des Enzyms zu protektiven Effekten führt. Diese Daten weisen auf den potentiellen Nutzen einer pharmakologischen AMPK-Aktivierung hin.

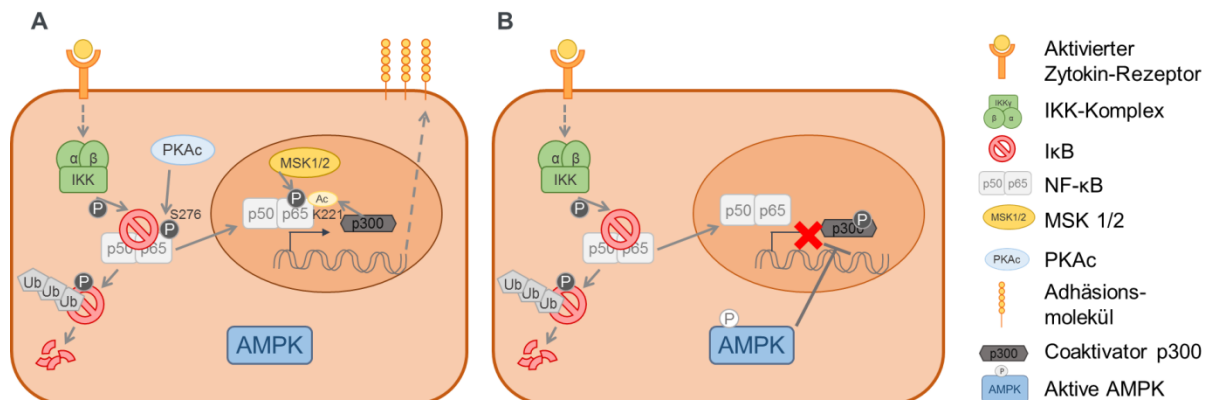


Abbildung 40: Eine aktivierte AMPK kann die Expression von Adhäsionsmolekülen hemmen – möglicher Mechanismus über eine Hemmung von NF-κB. **A** Nach Bindung von Liganden an Zytokin- oder Toll-like-Rezeptoren wird der IκB-Kinase-Komplex (IKK-Komplex) aktiviert, sodass dieser den Inhibitor von κB (IκB) phosphorylieren kann. IκB, der unter Ruhebedingungen NF-κB im Zytosol rekrutiert, wird nach Phosphorylierung ubiquitinyliert und abgebaut. NF-κB wird zur maximalen Aktivierung an seiner p65-Untereinheit durch verschiedene Kinasen wie Proteinkinase Ac (PKAc) und Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase 1/2 (MSK1/2) am Serinrest 276 (S276) phosphoryliert. Nach Translokation in den Zellkern bindet der Coaktivator *cAMP-response element-binding protein-binding protein* (CBP)/p300. p300 vermittelt eine aktivierende Acetylierung von NF-κB am Lysinrest 221 (K221) und fördert so die Gentranskription proinflammatorischer Mediatoren, was unter anderem zur Expression von Adhäsionsmolekülen führt. **B** Im aktivierten Zustand kann AMPK den Coaktivator p300 phosphorylieren und damit inhibieren. Damit entfällt dessen aktivierende Acetylierung von NF-κB und die NF-κB-vermittelte Gentranskription wird gehemmt.

4.8 Eine AMPK-Aktivierung, nicht aber eine Herunterregulierung der AMPKα1, beeinflusst die Zytokin-vermittelte Barrierestörung *in vitro*

Die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Permeabilitätsmessung zeigen, dass die Herunterregulierung der AMPKα1 die Zytokinmix-induzierte Barrierestörung nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu war die Zytokin-vermittelte Barrierestörung in Zellen, in denen AMPK durch AICAR aktiviert wurde, verzögert.

Der Einfluss einer AMPKα1-Herunterregulierung auf die endotheliale Permeabilität *in vitro* wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt. So beschreiben Xing et al., dass Endothelzellen der Lunge, die eine dominant negative Form der AMPK exprimieren, schon basal eine höhere Permeabilität als Kontrollzellen zeigen [171], was für eine barriestabilisierende Rolle einer funktionell intakten AMPK unter Ruhebedingungen spricht. Jian et al. berichten dagegen, dass Kontrollzellen und Zellen, in welchen AMPKα1 herunterreguliert ist, keinen Unterschied in der LPS-induzierten Barrierestörung aufweisen und bestätigen damit die Befunde der vorgelegten Arbeit [184]. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit zeigen die Autoren, dass eine AMPK-

Aktivierung durch AICAR eine LPS-induzierte Barrierestörung reduzieren kann [184]. Der schützende Effekt einer AICAR-Behandlung im Rahmen einer LPS-stimulierten Permeabilitätserhöhung in Endothelzellen wurde auch von Castanares-Zapatero et al. beobachtet. Die Wirkung von AICAR wurde dabei durch die Herunterregulierung der AMPK α 1 aufgehoben, womit die AMPK-Abhängigkeit des Effektes unterstrichen wurde [28]. Zusammen sprechen diese *in-vitro*-Befunde dafür, dass eine AMPK-Aktivierung die Barrierefunktion des Endothels unter inflammatorischen Bedingungen stabilisieren kann.

Eine offene Frage bleibt, weshalb der KO der AMPK α 1 *in vivo* und die Herunterregulierung des Enzyms *in vitro* unterschiedliche Auswirkungen zeigen. Während das Fehlen der AMPK α 1 *in vivo* zu einer deutlichen Verstärkung der vaskulären Permeabilität im Lebergewebe führte, gab es *in vitro* keinen Unterschied zwischen der Zytokinmix-induzierten Barrierestörung in Kontrollzellen und Zellen mit herunterregulierter AMPK α 1. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Barrierestörung *in vivo* deutlich komplexer verläuft und mehr Einflussfaktoren unterliegt als *in vitro*. Zum Beispiel kommt es *in vivo* zu Verstärkungsreaktionen durch Zytokin- und ROS-Freisetzung aus Makrophagen, die ebenfalls dem Einfluss der AMPK unterliegen können. In der Literatur wird beschrieben, dass AMPK die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen hemmt [109] und die NADPH-Oxidase in Neutrophilen inhibiert [185]. Letztere ist als Schlüsselenzym der Superoxid-Produktion unter anderem für eine Leberzellschädigung verantwortlich [186]. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit erhöhte Zytokinspiegel im Lebergewebe von AMPK α 1-KO-Mäusen gemessen wurden, spricht dafür, dass solche Prozesse auch in diesem Modell eine Rolle spielen. Zusätzlich könnten spezifische Eigenschaften der Lebersinusoiden für die beobachtete Differenz von *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimenten verantwortlich sein. Mechanismen, die zum Beispiel über eine Durchmessererweiterung der Fenestrierungen zur Permeabilitätserhöhung in der Leber führen, sind *in vitro* mit HUVEC nicht zu simulieren. Schließlich ist es möglich, dass der AMPK α 1-KO in den Hepatozyten selbst zur Akkumulation von proteinreicher Flüssigkeit im Gewebe beiträgt. AMPK soll zum Beispiel für die Polarisierung der Hepatozyten verantwortlich sein und Prozesse wie die Bildung von *tight junctions* und die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen [187].

4.9 Eine Herunterregulierung der AMPK α 1 *in vitro* beeinflusst die Claudin-5-Expression

Die in HUVEC erhobenen Daten dieser Arbeit zeigen eine Reduktion von Claudin-5 nach Stimulierung mit inflammatorischen Stimuli, die in Zellen mit herunterregulierter AMPK α 1 deutlicher ausgeprägt war. Diese Beobachtungen entsprechen den *in-vivo*-Befunden dieser

Arbeit, die einen stärker ausgeprägten Claudin-5-Verlust in den Lebersinusoiden und im Lebergewebe von LPS-behandelten AMPK α 1-KO-Mäusen nachweisen.

Eine Verminderung der Claudin-5-Expression nach LPS wurde auch von Zhao et al. beobachtet. Eine LPS-Stimulierung führte in ihren Experimenten zu einer Reduktion von Claudin-5 und Occludin in mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns und war mit einer Erhöhung der Permeabilität verbunden [188]. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die durch LPS induzierte ROS-Bildung ursächlich an den Veränderungen der *tight junction*-Proteine und der endothelialen Barriere beteiligt war. Eine Verminderung von intrazellulären ROS-Spiegeln durch Überexpression der Superoxiddismutase oder Gabe eines Inhibitors der NADPH-Oxidase bewirkte eine signifikante Verringerung des Verlusts von Claudin-5 und Occludin. Die Reduktion eines weiteren *tight junction*-Proteins, des ZO-1-Proteins, nach LPS-Behandlung von koronaren arteriellen Endothelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen der Haut wurde von Castanares-Zapatero et al. beschrieben [28].

Claudin-5 wird laut Literatur in Abhängigkeit von bereits ausgebildeten Adhäsionsverbindungen exprimiert. Sind diese beim Wachstum von Endothelzellen noch nicht ausgebildet, wird der Promotor von Claudin-5 durch den Transkriptionsfaktor *Forkhead box protein O1* (FoxO1), der mit β -Catenin kolokalisiert, gehemmt (Abbildung 41A). Die Ausbildung von Adhäsionsverbindungen führt zur Rekrutierung von β -Catenin an das an der Zellmembran lokalisierte VE-Cadherin, welches dadurch am Aktinzytoskelett verankert wird, wodurch die Zell-Zell-Verbindungen stabilisiert werden können. Durch die Membranlokalisation von β -Catenin sowie durch Akt-vermittelte Phosphorylierung von FoxO1 mit nachfolgendem Export des Transkriptionsfaktors in das Zytosol wird die Repression der Transkription von Claudin-5 aufgehoben. Claudin-5 wird nun exprimiert und *tight junctions* können ausgebildet werden [162,189,190] (Abbildung 41B). Werden die Zell-Zell-Kontakte wieder gelockert, so translozieren β -Catenin und FoxO1 zurück in den Kern und hemmen dort wieder die Claudin-5-Expression (Abbildung 41C).

Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zu Auflösung der Zell-Zell-Kontakte, indem eine Phosphorylierung der *non-muscular myosin light chain* (nmMLC) die Kontraktion des Zytoskeletts und letztendlich die Lockerung von Zell-Zell-Verbindungen bewirkt [162] (Abbildung 41C). Die Kontraktion des Aktinzytoskeletts ist zudem mit einer Umverteilung von Claudin-5 verbunden [29]. Auch ROS spielen bei der Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte eine Rolle [98,148,188,189]. Wie bereits diskutiert führen ROS zu einem Verlust von Claudin-5 und Occludin, sodass angenommen werden kann, dass parallel zur Auflösung der *tight junctions* ein Abbau der *tight junction*-Proteine stattfindet. Ein Abbau von Claudin-5 durch MMPs [169] und das Proteasom [170] könnte daher erklären, warum Entzündungsmediatoren eine Verringerung der Claudin-5-Proteinkonzentration in

Endothelzellen bewirken. Claudin-5-Level der Zelle können zusätzlich durch Regulation der Expression beeinflusst werden, wobei der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Rolle zu spielen scheint. Die Bindung von NF- κ B an den Promotor des Claudin-5-Gens nach Einwirkung von proinflammatorischen Stimuli führt zu einer Repression der Transkription von Claudin-5 [191–193]. In Übereinstimmung damit beschreiben Beard et al., dass IL-1 β in Zellen zu einer reduzierten Lokalisation von Claudin-5 in *tight junctions* bei verringertem Protein- und mRNA-Level führt [162].

Die Mechanismen, die zu einem stärkeren Verlust von Claudin-5 bei Abwesenheit von AMPK führen, sind bisher noch unklar. Möglicherweise interferiert AMPK in Endothelzellen mit der ROS-Bildung und inhibiert dadurch den Abbau der *tight junction*-Proteine. In Übereinstimmung damit wurde von Zhao et al. gezeigt, dass die Gabe des AMPK-Aktivators AICAR die LPS-induzierte Verminderung von Claudin-5 und Occludin verhinderte, was auf die AMPK-vermittelte Hemmung der NADPH-Oxidase zurückgeführt wurde [188]. Es ist auch denkbar, dass AMPK durch Phosphorylierung einer oder mehrerer Komponenten der Zell-Zell-Verbindungen zur Stabilisierung von *tight junctions* beiträgt. Es ist zum Beispiel bekannt, dass Claudin-5 über posttranslationale Modifikationen reguliert wird [194] und kürzlich wurde Cingulin, ein weiteres *tight junction*-Protein, als Zielprotein von AMPK identifiziert [195].

Obwohl die hier vorliegenden Daten eine verminderte basale Expression und einen größeren Verlust von Claudin-5 nach Behandlung mit inflammatorischen Stimuli in kultivierten Endothelzellen mit herunterregulierter AMPK α 1 zeigen, spiegeln sich diese Veränderungen nicht in der *in-vitro*-Permeabilitätsmessung wider, bei der die Barriereveränderung durch AMPK α 1-Depletion nicht beeinflusst wurde. Dagegen fand in den *in-vivo*-Experimenten die Permeabilitätserhöhung parallel zu einem Claudin-5-Verlust statt. Über die Ursachen kann nur spekuliert werden. Möglicherweise spielen *in vivo* noch weitere AMPK-abhängige Prozesse eine Rolle, die einen Einfluss auf die Permeabilität haben. Zusätzlich können speziesspezifische Unterschiede oder Unterschiede, die auf der Heterogenität der Endothelzellen beruhen, von Bedeutung sein (siehe auch 4.8).

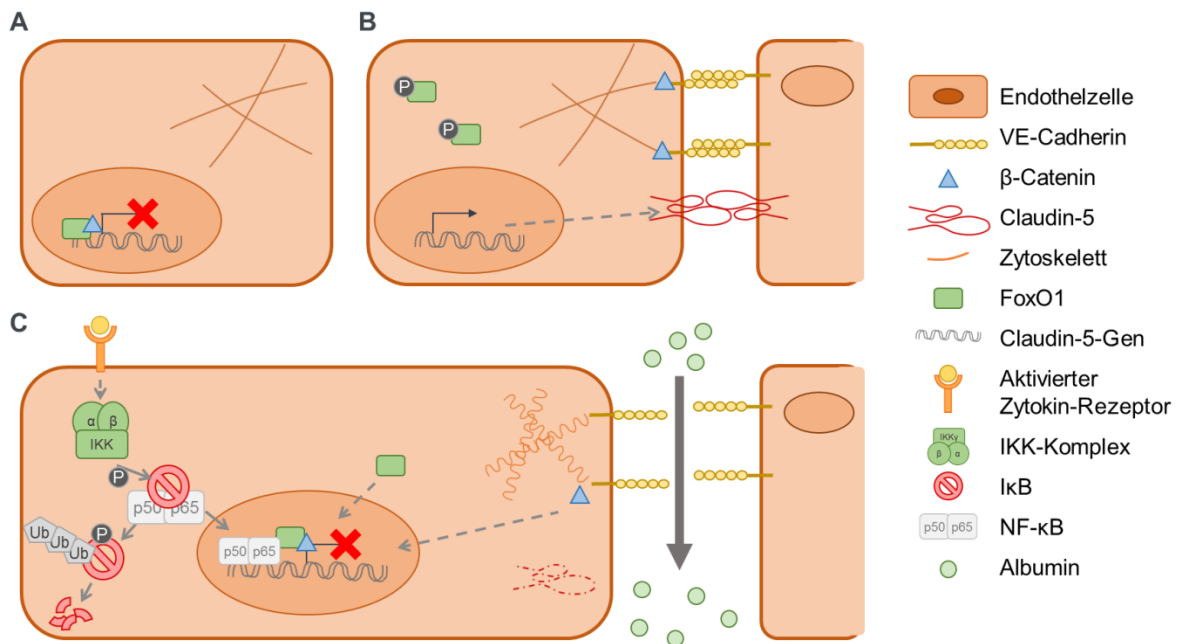


Abbildung 41: Expression von Claudin-5 und sein Abbau unter Entzündungsbedingungen.

A In Endothelzellen, die noch keine Adhäsionsverbindungen ausbilden, wird der Promotor von Claudin-5 durch den Transkriptionsfaktor Forkhead box protein O1 (FoxO1), der mit β-Catenin kolokalisiert, gehemmt. **B** Die Ausbildung von Adhäsionsverbindungen führt zur Rekrutierung von β-Catenin an das an der Zellmembran lokalisierte vascular-endothelial cadherin (VE-Cadherin), welches dadurch am Aktinzytoskelett verankert wird. Durch die Membranlokalisation von β-Catenin sowie durch Proteinkinase B (PKB/Akt)-vermittelte Phosphorylierung von FoxO1 mit nachfolgendem Export des Transkriptionsfaktors in das Zytosol wird die Repression der Transkription von Claudin-5 aufgehoben, Claudin-5 wird exprimiert und *tight junctions* können ausgebildet werden. **C** Unter Entzündungsbedingungen kommt es zur Kontraktion des Zytoskeletts und somit zur Lockerung von Adhäsionsverbindungen. β-Catenin und FoxO1 translozieren in den Kern und hemmen dort die Claudin-5-Expression. Zusätzlich kann die Claudin-5-Expression über NF-κB reguliert werden. Entzündungsmediatoren wie TNF-α aktivieren den IκB-Kinase-Komplex (IKK-Komplex). Dieser phosphoryliert den Inhibitor von κB (IκB), welcher dann ubiquitinyliert und abgebaut wird. NF-κB transloziert in den Zellkern und hemmt durch Bindung an den Promotor des Claudin-5-Gens die Claudin-5-Expression.

4.10 Die Aktivierung der AMPK reduziert die Zytokin-vermittelte Barrierestörung *in vivo*

Die bisher diskutierten Untersuchungen an AMPKα1-KO-Mäusen weisen auf eine deutliche barriestabilisierende und antiinflammatorische Wirkung der AMPKα1 unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung hin. Diese protektive Wirkung wurde in einer *in-vivo*-Behandlungsstudie zusätzlich erhärtet. Eine Aktivierung der AMPK durch Administration von AICAR verursachte eine signifikante Eindämmung der durch nachfolgende LPS-Injektion induzierten Permeabilitätserhöhung in der Leber von WT-Mäusen. Diese Daten lassen vermuten, dass die Aktivierung der AMPK eine neue therapeutische Strategie darstellt, um mikrovaskuläre Dysfunktion bei systemischer Entzündung zu beeinflussen.

Diese Strategie wird durch weitere Literaturdaten gestützt. So wird beschrieben, dass eine Vorbehandlung mit AMPK-Aktivatoren zu einer Verminderung der Barrierestörung nach Auslösung einer systemischen Entzündung oder Sepsis führt [28,171,173]. Auch die gleichzeitige Gabe eines AMPK-Aktivators und eines inflammatorischen Stimulus [196] sowie die Administration eines AMPK-Agonisten nach Auslösung einer systemischen Entzündung [184] führte zu einer Verbesserung der vaskulären Barrierestörung. Dabei wurden sowohl AICAR als auch Metformin als AMPK-Aktivatoren eingesetzt [184]. Die Studien beschäftigen sich vor allem mit Lunge [171,196], Herz [28] und der Blut-Hirn-Schranke [98]. Parallel zur Verbesserung der vaskulären Permeabilität wurde auch eine Verminderung der systemischen Entzündung nach Auslösen einer Sepsis im Mausexperiment durch AICAR nachgewiesen [173]. Die hier vorgelegten Daten ergänzen die bisher publizierten Arbeiten um Befunde in der Leber und machen deutlich, dass eine AMPK-Aktivierung vermutlich eine generelle antiinflammatorische Wirkung hat.

Die *in-vivo*-Effekte einer AMPK-Aktivierung sind mit den in 4.7 bis 4.9 diskutierten Wirkungen der AMPK zu erklären. Eine Aktivierung der AMPK kann laut Literatur den NF- κ B-Signalweg hemmen [62,103,104,176] und dies kann Auswirkungen auf die Barrierefunktion, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion von Zytokinen haben, also insgesamt das Entzündungsgeschehen vermindern. NF- κ B beeinflusst die Barrierefunktion beispielsweise über eine Aktivierung des Rho-Kinase-Weges, der zur Kontraktion des Aktinzytoskeletts führt und dadurch die Entstehung interzellulärer Lücken fördert [29], oder über eine Hemmung der Claudin-5-Expression [191–193]. Weiterhin wird über den NF- κ B-Signalweg die Aktivität der NADPH-Oxidase und in Folge dessen die ROS-Bildung gesteigert, was zu ROS-abhängigen Veränderungen der endothelialen Barriere führen kann. All diese Wirkungen würden durch die Aktivierung der AMPK mit nachfolgender Hemmung des NF- κ B-Signalwegs vermindert werden (Abbildung 42). Des Weiteren sind direkte Wirkungen der AMPK auf die Proteine der Zell-Zell-Verbindungen zu vermuten. In zukünftigen Versuchen sind die Mechanismen der AICAR-induzierten Schutzwirkung weiter aufzuklären. Eine Färbung von Claudin-5 in Leberschnitten AICAR-vorbehandelter Tiere würde beispielsweise weitere Hinweise darauf geben, ob AICAR wie angenommen *tight junctions* stabilisiert.

Die Schutzwirkung von AICAR *in vivo* beschränkt sich nicht nur auf protektive Wirkungen an Endothelzellen. Wie bereits diskutiert, hemmt AMPK-Aktivierung auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen [109] und die NADPH-Oxidase in Neutrophilen [185], sodass Prozesse, die eine Verstärkung der Barrierestörung induzieren könnten, durch AICAR unterbrochen werden. Eine Diskriminierung zwischen endothelvermittelten und anderen Effekten wäre durch Untersuchung endothelspezifischer AMPK α 1-KO-Mäuse möglich.

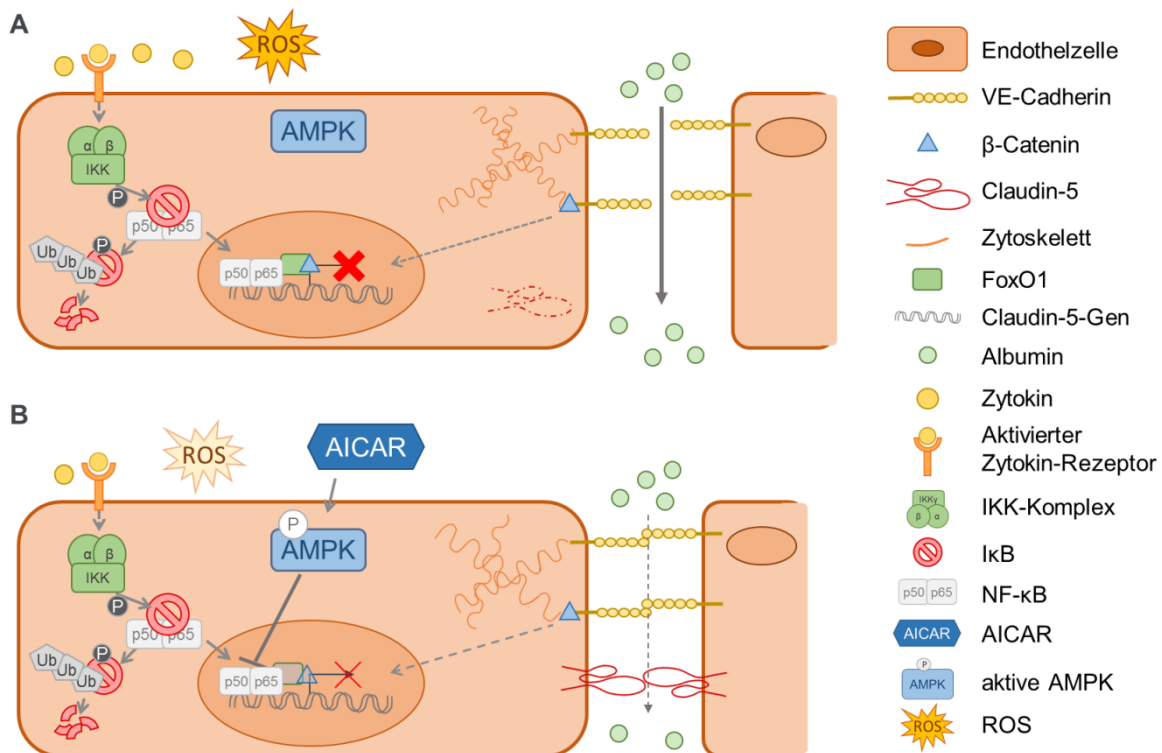


Abbildung 42: Möglicher Mechanismus der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten durch eine aktivierte AMPK im Leberendothel. **A** Unter Entzündungsbedingungen kommt es durch Kontraktion des Zytoskeletts unter dem Einfluss verschiedener Mediatoren wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Lockerung der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen. Die von *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin) ausgebildeten Adhäsionsverbindungen werden destabilisiert. Hierdurch kommt es zu einer Translokation von β -Catenin in den Zellkern, wo es zusammen mit Forkhead box protein O1 (FoxO1) an den Claudin-5-Promotor bindet und die Claudin-5-Expression hemmt. Zudem wird Claudin-5 aufgrund der Destabilisierung der *tight junctions* abgebaut. Gleichzeitig aktivieren Entzündungsmediatoren wie TNF- α den I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex). Dieser phosphoryliert den Inhibitor von κ B (I κ B), welcher ubiquitinyliert und abgebaut wird. NF- κ B transloziert in den Zellkern und hemmt durch Bindung an den Promotor des Claudin-5-Gens die Claudin-5-Expression. Der Abbau von Claudin-5 zusammen mit einer gehemmten Claudin-5-Neuexpression führt zum Verlust von *tight junctions* und somit zu einer Permeabilitätserhöhung der Endothelschicht, woraufhin große Moleküle wie Albumin ungehindert die Barriere passieren können. **B** Wird AMPK über AICAR aktiviert, so ist die Entzündungssituation und der oxidative Stress in der Leber vermindert und die Barrierefunktion der Endothelzellen bleibt besser erhalten. Zudem kann eine aktivierte AMPK in den Endothelzellen die Wirkung von NF- κ B hemmen und die NF- κ B-vermittelte Repression der Expression von Claudin-5 vermindern. *Tight junctions* werden so stabilisiert und die durch die Entzündungssituation hervorgerufene Permeabilitätserhöhung wird vermindert.

4.11 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die AMPK unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung eine maßgebliche antiinflammatorische Rolle spielt. Dies zeigte sich zum einen anhand einer erhöhten systemischen Entzündung und erhöhten Mortalität nach LPS-Administration bei weiblichen AMPK α 1-KO-Mäusen. Zum anderen war bei weiblichen und männlichen AMPK α 1-KO-Mäusen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität in der Leber festzustellen, die mit einer verstärkten lokalen Entzündung und Schädigung des Lebergewebes verbunden war. Ursächlich spielt dabei vermutlich eine durch AMPK α 1-KO hervorgerufene stärkere Verminderung im Gehalt des *tight junction*-Proteins Claudin-5 nach LPS-Einwirkung eine Rolle. Damit wird ein bisher nicht bekannter Phänotyp der AMPK α 1-KO-Mäuse unter den Bedingungen der systemischen Entzündung beschrieben. Die hier erhobenen Daten zeigen weiterhin, dass eine *in-vivo*-Aktivierung der AMPK mit der Substanz AICAR zu einer Verminderung der LPS-induzierten Barrierestörung in der Leber führte. Daraus ist zu schlussfolgern, dass eine Aktivierung der AMPK eine therapeutische Strategie zur Verhinderung oder Verminderung der vaskulären Dysfunktion und der damit verbundenen Organschädigung bei systemischer Entzündung darstellt. Die Bedeutung von Therapien, die die endotheliale Integrität und Barriere schützen, wurde kürzlich in einem Übersichtsartikel zu Therapiemöglichkeiten der Sepsis herausgestellt. Obwohl die mikrovaskuläre Dysfunktion eng mit Entstehung von Organversagen korreliert und bei allen Sepsispatienten zu beobachten ist, gibt es bisher keine geeigneten Therapien [38]. Zukünftige Untersuchungen sollen die Rolle der AMPK α 1 weiter charakterisieren. Dazu sollten Sepsismodelle, gewebespezifische AMPK α 1-KO-Mausmodelle sowie geeignete zelluläre Modelle eingesetzt werden, um Einblicke in die mechanistischen Grundlagen der beobachteten Effekte zu erhalten.

5 Literatur

- [1] W.C. Aird, "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms," *Circulation Research*, vol. 100, 2007, pp. 158–173.
- [2] H.F. Galley and N.R. Webster, "Physiology of the endothelium," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 93, 2004, pp. 105–113.
- [3] C.E. Hack and S. Zeerleder, "The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation," *Critical Care Medicine*, vol. 29, 2001, pp. S21–S27.
- [4] W.C. Aird, "Spatial and temporal dynamics of the endothelium," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, 2005, pp. 1392–1406.
- [5] B.J. Hunt, "Endothelial cell activation," *BMJ: British Medical Journal*, vol. 316, 1998, pp. 1328–1329.
- [6] W.C. Aird, "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds," *Circulation Research*, vol. 100, 2007, pp. 174–190.
- [7] S.M. Albelda, P.D. Oliver, L.H. Romer, and C.A. Buck, "EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule," *Journal of Cell Biology*, vol. 110, 1990, pp. 1227–1237.
- [8] G. Bazzoni and E. Dejana, "Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis," *Physiological Reviews*, vol. 84, 2004, pp. 869–901.
- [9] K. Morita, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita, "Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells," *Journal of Cell Biology*, vol. 147, 1999, pp. 185–194.
- [10] L. Leach, P. Clark, M.G. Lampugnani, A.G. Arroyo, E. Dejana, and J.A. Firth, "Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta," *Journal of Cell Science*, vol. 104, 1993, pp. 1073–1081.
- [11] M.J. Karnovsky, "The Ultrastructural Basis of Transcapillary Exchanges," *The Journal of General Physiology*, vol. 52, 1968, pp. 64–95.
- [12] E. Wisse, F. Braet, D. Luo, R.D. Zanger, D. Jans, E. Crabbé, and A. Vermoesen, "Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver," *Toxicologic Pathology*, vol. 24, 1996, pp. 100–111.
- [13] M.A.J. Gimbrone, R.S. Cotran, and J. Folkman, "Human Vascular Endothelial Cells in Culture. Growth and DNA synthesis," *Journal of Cell Biology*, vol. 60, 1974, pp. 673–684.
- [14] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick, "Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins, Identification by morphologic and immunologic criteria," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, 1973, pp. 2745–2756.
- [15] I. Cinel and S.M. Opal, "Molecular Biology of inflammation and sepsis: A primer," *Critical Care Medicine*, vol. 37, 2009, pp. 291–300.
- [16] J.S. Pober, "Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells," *Ciba Foundation Symposium*, vol. 131, 1987, pp. 170–184.
- [17] S.M. Dauphinee and A. Karsan, "Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells," *Laboratory Investigation*, vol. 86, 2006, pp. 9–22.
- [18] C.W. Lee, W.N. Lin, C.C. Lin, S.F. Luo, J.S. Wang, J. Pouyssegur, and C.M. Yang, "Transcriptional regulation of VCAM-1 expression by tumor necrosis factor- α in human tracheal smooth muscle cells: involvement of MAPKs, NF- κ B, p300, and histone acetylation," *Journal of Cell Physiology*, vol. 207, 2006, pp. 174–186.
- [19] S. Frantz, G. Ertl, and J. Bauersachs, "Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease," *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, vol. 4, Aug. 2007, pp. 444–464.
- [20] C.A. Jefferies and L.A.J. O'Neill, "Rac1 Regulates Interleukin 1-induced Nuclear Factor κ B Activation in an Inhibitory Protein κ Ba-independent Manner by Enhancing the Ability of the p65 Subunit to Transactivate Gene Expression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, 2000, pp. 3114–3120.

-
- [21] T. Kawai and S. Akira, "TLR signaling," *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, 2006, pp. 816–825.
 - [22] H. Zhang and C. Zhang, "Vasoprotection by Dietary Supplements and Exercise: Role of TNFalpha Signaling," *Experimental Diabetes Research*, vol. 2012, 2012.
 - [23] M.P. Bevilacqua, J.S. Pober, D.L. Mendrick, R.S. Cotran, and M.A.J. Gimbrone, "Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, 1987, pp. 9238–9242.
 - [24] M.L. Dustin, R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, and T.A. Springer, "Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).," *Journal of Immunology*, vol. 137, 1986, pp. 245–254.
 - [25] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyi, G. Chi-Rosso, and R. Lobb, "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes," *Cell*, vol. 59, Dec. 1989, pp. 1203–1211.
 - [26] N. Strebe, A. Guse, M. Schüngel, T. Schirrmann, M. Hafner, T. Jostock, M. Hust, W. Müller, and S. Dübel, "Functional knockdown of VCAM-1 at the posttranslational level with ER retained antibodies," *Journal of Immunological Methods*, vol. 341, 2009, pp. 30–40.
 - [27] L. Yang, R.M. Froio, T.E. Sciuto, A.M. Dvorak, R. Alon, and F.W. Luscinska, "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow," *Blood*, vol. 106, Jul. 2005, pp. 584–592.
 - [28] D. Castanares-Zapatero, C. Bouleti, C. Sommereyns, B. Gerber, C. Lecut, T. Mathivet, M. Horckmans, D.C. D, M. Foretz, J.L. Vanoverschelde, S. Germain, L. Bertrand, P.F. Laterre, C. Oury, B. Viollet, S. Horman, and C. Beauloye, "Connection between cardiac vascular permeability, myocardial oedema and inflammation during sepsis : role of AMP-activated kinase," *Critical Care Medicine*, vol. 41, Dec. 2013, pp. 411–422.
 - [29] P.R. Clark, R.K. Kim, J.S. Pober, and M.S. Kluger, "Tumor Necrosis Factor Disrupts Claudin-5 Endothelial Tight Junction Barriers in Two Distinct NFkappaB-Dependent Phases," *PLoS One*, vol. 10, 2015.
 - [30] N.S. Harhaj and D.A. Antonetti, "Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, 2004, pp. 1206–1237.
 - [31] N.M. Goldenberg, B.E. Steinberg, A.S. Slutsky, and W.L. Lee, "Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis," *Science Translational Medicine*, vol. 3, Jun. 2011, p. 88ps25.
 - [32] J.A. McKenzie and A.J. Ridley, "Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability," *Journal of Cell Physiology*, vol. 213, 2007, pp. 221–228.
 - [33] K. Peters, R.E. Unger, J. Brunner, and C.J. Kirkpatrick, "Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis," *Cardiovascular Research*, vol. 60, 2003, pp. 49–57.
 - [34] W.C. Aird, "The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome," *Blood*, vol. 101, 2003, pp. 3765–3777.
 - [35] W.C. Aird, "Vascular bed-specific hemostasis: Role of endothelium in sepsis pathogenesis," *Critical Care Medicine*, vol. 29, 2001, pp. S28–S35.
 - [36] N.I. Shapiro, P. Schuetz, K. Yano, M. Sorasaki, S.M. Parikh, A.E. Jones, S. Trzeciak, L. Ngo, and W.C. Aird, "The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis," *Critical Care*, vol. 14, 2010, p. R182.
 - [37] W.L. Lee and W.C. Liles, "Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections," *Current Opinion in Hematology*, vol. 18, 2011, pp. 191–196.
 - [38] J. Cohen, J.-L. Vincent, N.K.J. Adhikari, F.R. Machado, D.C. Angus, T. Calandra, K. Jaton, S. Giulieri, J. Delaloye, S. Opal, K. Tracey, T. van der Poll, and E. Pelfrene, "Sepsis: a roadmap for future research," *The Lancet Infectious Diseases Commission*, vol. 15, 2015, pp. 581–614.

- [39] E. Dejana, "Endothelial cell-cell junctions: happy together," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, Apr. 2004, pp. 261–270.
- [40] D. Metha and A.B. Malik, "Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability," *Physiological Reviews*, vol. 86, 2006, pp. 279–367.
- [41] G. Bazzoni, "Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, 2006, pp. 36–42.
- [42] S.Y. Yuan and R.R. Rigor, *Regulation of Endothelial Barrier Function*, Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [43] B. Razani and M.P. Lisanti, "Caveolins and Caveolae: Molecular and Functional Relationships," *Experimental Cell Research*, vol. 271, 2001, pp. 36–44.
- [44] W. Schubert, P.G. Frank, B. Razani, D.S. Park, C.-W. Chow, and M.P. Lisanti, "Caveolae-deficient Endothelial Cells Show Defects in the Uptake and Transport of Albumin in Vivo," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, 2001, pp. 48619–48622.
- [45] A. Spicer and C.S. Calfee, "Fixing the leak: targeting the vascular endothelium in sepsis," *Critical Care*, vol. 16, 2012, p. 177.
- [46] R. Medzhitov, "Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame," *Cell*, vol. 140, 2010, pp. 771–776.
- [47] M.E. Bianchi, "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, 2007, pp. 1–3.
- [48] M.T. Lotze, A. Deisseroth, and A. Rubartelli, "Damage associated molecular pattern molecules," *Clinical Immunology*, vol. 124, 2007, pp. 1–4.
- [49] K.M. Murphy, P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology*, Garland Publishing, 2008.
- [50] D.C. Angus and T. van der Poll, "Severe Sepsis and Septic Shock," *New England Journal of Medicine*, vol. 369, 2013, pp. 840–850.
- [51] D. Annane, E. Bellissant, and J.-M. Cavailon, "Septic shock," *The Lancet*, vol. 365, 2005, pp. 63–78.
- [52] H.K. de Jong, T. van der Poll, and W.J. Wiersinga, "The Systemic Pro-Inflammatory Response in Sepsis," *Journal of Innate Immunity*, vol. 2, 2010, pp. 422–430.
- [53] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald, "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.," *Chest*, vol. 101, 1992, pp. 1644–1655.
- [54] D. Rittirsch, M.A. Flierl, and P.A. Ward, "Harmful molecular mechanisms in sepsis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, 2008, pp. 776–787.
- [55] N.C. Riedemann, R.-F. Guo, and P.A. Ward, "The enigma of sepsis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, 2003, pp. 460–467.
- [56] J. Cohen, "The immunopathogenesis of sepsis," *Nature*, vol. 420, 2002, pp. 886–891.
- [57] R. Bezemer, S.A. Bartels, J. Bakker, and C. Ince, "Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill—where do we stand?," *Critical Care*, vol. 16, 2012, p. 224.
- [58] C.A.C. und K.H. Kim, "Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, 1973, pp. 378–380.
- [59] Z.H. Beg, D.W. Allmann, and D.M. Gibson, "Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol.," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 54, 1973, pp. 1362–1369.

- [60] D. Carling, P.R. Clarke, V.A. Zammit, and D.G. Hardie, "Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities.," *European Journal of Biochemistry*, vol. 186, 1989, pp. 129–136.
- [61] M.-A. Ewart and S. Kennedy, "AMPK and vasculoprotection," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 131, 2011, pp. 242–253.
- [62] B. Fisslthaler and I. Fleming, "Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells," *Circulation Research*, vol. 105, Jul. 2009, pp. 114–127.
- [63] D.G. Hardie, "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy," *Nature Reviews*, vol. 8, 2007, pp. 774–785.
- [64] D.G. Hardie and D. Carling, "The AMP-activated protein kinase: Fuel gauge of the mammalian cell?," *European Journal of Biochemistry*, vol. 246, 1997, pp. 259–273.
- [65] G.R. Steinberg and B.E. Kemp, "AMPK in Health and Disease," *Physiological Reviews*, vol. 89, 2009, pp. 1025–1078.
- [66] B. Viollet, S. Horman, J. Leclerc, L. Lantier, M. Foretz, M. Billaud, S. Giri, and F. Andreelli, "AMPK Inhibition in health and disease," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 45, 2010, pp. 276–295.
- [67] M.J. Sanders, P.O. Grondin, B.D. Hegarty, M.A. Snowden, and D. Carling, "Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade," *Biochemical Journal*, vol. 403, 2007, pp. 139–148.
- [68] S.A. Hawley, J. Boudeau, J.L. Reid, K.J. Mustard, L. Udd, T.P. Mäkelä, D.R. Alessi, and D.G. Hardie, "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade.," *Journal of Biology*, vol. 2, 2003, pp. 28.1–28.16.
- [69] A. Woods, S.R. Johnstone, K. Dickerson, F.C. Leiper, L.G.D. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling, "LKB1 is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade," *Current Biology*, vol. 13, 2003, pp. 2004–2008.
- [70] S.A. Hawley, D.A. Pan, K.J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A.M. Edelman, B.G. Frenguelli, and D.G. Hardie, "Calmodulin-dependent protein kinase kinase beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase," *Cell Metabolism*, vol. 2, 2005, pp. 9–19.
- [71] R.L. Hurley, K.A. Anderson, J.M. Franzone, B.E. Kemp, A.R. Means, and L.A. Witters, "The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, 2005, pp. 29060–29066.
- [72] A. Woods, K. Dickerson, R. Heath, S.P. Hong, M. Momcilovic, S.R. Johnstone, M. Carlson, and D. Carling, "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells," *Cell Metabolism*, vol. 2, 2005, pp. 21–33.
- [73] M. Momcilovic, S.-P. Hong, and M. Carlson, "Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in vitro," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, 2006, pp. 25336–25343.
- [74] M. Xie, D. Zhang, J.R.B. Dyck, Y. Li, H. Zhan, M. Morishima, D.L. Mann, G.E. Taffet, A. Baldini, D.S. Khoury, and M.D. Schneider, "A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, 2006, pp. 17378–83.
- [75] L.H. Young, "AMP-Activated Protein Kinase Conducts the Ischemic Stress Response Orchestra," *Circulation*, vol. 117, 2008, pp. 832–840.
- [76] M. Suter, U. Riek, R. Tuerk, U. Schlattner, T. Wallimann, and D. Neumann, "Dissecting the Role of 5'-AMP for Allosteric Stimulation, Activation, and Deactivation of AMP-activated Protein Kinase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, 2006, pp. 32207–32216.

- [77] B.E. Kemp, D. Stapleton, D.J. Campbell, Z.-P. Chen, S. Murthy, M. Walter, A. Gupta, J.J. Adams, F. Katsis, B. van Denderen, I.G. Jennings, T. Iseli, B.J. Michell, and L.A. Witters, "AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator," *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, 2003, pp. 162–168.
- [78] D.G. Hardie, "AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function," *Genes & Development*, vol. 25, 2011, pp. 1895–1908.
- [79] J.M. Cacicedo, N. Yagihashi, J.F.J. Keaney, N.B. Ruderman, and Y. Ido, "AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 324, 2004, pp. 1204–1209.
- [80] G. Zhou, I.K. Sebhat, and B.B. Zhang, "AMPK activators – potential therapeutics for metabolic and other diseases," *Acta Physiologica*, vol. 196, 2009, pp. 175–190.
- [81] M.R. Owen, E. Doran, and A.P. Halestrap, "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic action through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain," *Biochemical Journal*, vol. 348, 2000, pp. 607–614.
- [82] Q. Xu and L.-Y. Si, "Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 14, 2010, pp. 2604–2613.
- [83] M.-H. Zou and Y. Wu, "AMP-Activated Protein Kinase activation is a strategy for protecting Vascular Endothelial function," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 35, 2008, pp. 535–545.
- [84] B. Thors, H. Halldórsson, and G. Thorgeirsson, "eNOS activation mediated by AMPK after stimulation of endothelial cells with histamine or thrombin is dependent on LKB1," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1813, 2011, pp. 322–331.
- [85] M. Quintero, S.L. Colombo, A. Godfrey, and S. Moncada, "Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, 2006, pp. 5379–5384.
- [86] Z. Dagher, N. Ruderman, K. Tornheim, and Y. Ido, "Acute Regulation of Fatty Acid Oxidation and AMP-Activated Protein Kinase in Human Umbilical Vein Endothelial Cells," *Circulation Research*, vol. 88, 2001, pp. 1276–1282.
- [87] Z. Dagher, N. Ruderman, K. Tornheim, and Y. Ido, "The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 265, 1999, pp. 112–115.
- [88] Z.-P. Chen, K.I. Mitchelhill, B.J. Michell, D. Stapleton, I. Rodriguez-Crespo, L.A. Witter, D.A. Power, P.R.O. de Montellano, and B.E. Kemp, "AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase," *FEBS Letters*, vol. 443, 1999, pp. 285–289.
- [89] V.A. Morrow, F. Fofelle, J.M.C. Connell, J.R. Petrie, G.W. Gould, and I.P. Salt, "Direct Activation of AMP-activated Protein Kinase Stimulates Nitric-oxide Synthesis in Human Aortic Endothelial Cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, Aug. 2003, pp. 31629–31639.
- [90] B. Thors, H. Halldórsson, and G. Thorgeirsson, "Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt," *FEBS Letters*, vol. 573, 2004, pp. 175–180.
- [91] N. Stahmann, A. Woods, D. Carling, and R. Heller, "Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta," *Molecular Cell Biology*, vol. 26, 2006, pp. 5933–5945.
- [92] D. Nagata, M. Mogi, and K. Walsh, "AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Signaling in Endothelial Cells Is Essential for Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 33, 2003, pp. 31000–31006.

-
- [93] N. Stahmann, A. Woods, K. Spengler, A. Heslegrave, R. Bauer, S. Krause, B. Viollet, D. Carling, and R. Heller, "Activation of AMP-activated Protein Kinase by Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Endothelial Angiogenesis Independently of Nitric-oxide Synthase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, 2010, pp. 10628–10652.
 - [94] S.M. Baumgartner-Parzer, L. Wagner, M. Pettermann, J. Grillari, A. Gessl, and W. Waldhausl, "High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells," *Diabetes*, vol. 44, 1995, pp. 1323–1327.
 - [95] Y. Ido, D. Carling, and N. Ruderman, "Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells," *Diabetes*, vol. 51, 2002, pp. 159–167.
 - [96] N.B. Rudermann, J.M. Cacicedo, S. Itani, N. Yagihashi, A.K. Saha, J.M. Ye, K. Chen, M. Zou, D. Carling, G. Boden, R.A. Cohena, J. Keaney, E.W. Kraegen, and Y. Ido, "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes," *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, 2003, pp. 202–206.
 - [97] M.F. McCarty, "AMPK activation may suppress hepatic production of C-reactive protein by stimulating nitric oxide synthase," *Medical Hypotheses*, vol. 63, 2004, pp. 328–333.
 - [98] H.-Y. Yu, Y.-B. Cai, and Z. Liu, "Activation of AMPK improves Lipopolysaccharide-induced dysfunction of the blood-brain-barrier in mice," *Brain Injury*, vol. 29, 2015, pp. 777–784.
 - [99] A. Salminen, J.M.T. Hyttinen, and K. Kaarniranta, "AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 89, 2011, pp. 667–676.
 - [100] C.J. Green, K. Macrae, S. Fogarty, D.G. Hardie, K. Sakamoto, and H.S. Hundal, "Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor kappaB signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase," *Biochemical Journal*, vol. 435, 2011, pp. 463–474.
 - [101] I.P. Salt and T.M. Palmer, "Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 21, Aug. 2012, pp. 1155–1167.
 - [102] S. Giri, N. Nath, B. Smith, B. Viollet, A.K. Singh, and I. Singh, "5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase.," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, Jan. 2004, pp. 479–487.
 - [103] C. Li and J.F.J. Keaney, "AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease.," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 10, Apr. 2010, pp. 111–115.
 - [104] Y. Zhang, J.Qiu, X. Wang, Y. Zhang, and M. Xia, "AMP-Activated Protein Kinase Suppresses Endothelial Cell Inflammation Through Phosphorylation of Transcriptional Coactivator p300," *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 31, Dec. 2011, pp. 2897–2908.
 - [105] Y. Hattori, K. Suzuki, S. Hattori, and K. Kasai, "AMP-Activated Protein Kinase Activation in Vascular Endothelial Cells Metformin Inhibits Cytokine-Induced Nuclear Factor kappaB Activation Via," *Hypertension*, vol. 47, 2006, pp. 1183–1188.
 - [106] M. Katerelos, S.J. Mudge, D. Stapleton, R.B. Auwardt, S.A. Fraser, C.-G. Chen, B.E. Kemp, and D.A. Power, "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF-kappaB," *Immunology and Cell Biology*, vol. 88, 2010, pp. 754–760.
 - [107] M.-A. Ewart, C.F. Kohlhaas, and I.P. Salt, "Inhibition of Tumor Necrosis Factor alpha-Stimulated Monocyte Adhesion to Human Aortic Endothelial Cells by AMP-Activated Protein Kinase," *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 28, 2008, pp. 2255–2257.

-
- [108] W. Yang, Y.H. Hong, X.Q. Shen, C. Frankowski, H.S. Camp, and T. Leff, "Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, 2001, pp. 38341–38344.
 - [109] D. Sag, D. Carling, R.D. Stout, and J. Surtles, "Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype," *The Journal of Immunology*, vol. 181, 2008, pp. 8633–8641.
 - [110] G.R. Steinberg, B.J. Michell, B.J.W. van Denderen, M.J. Watt, A.L. Carey, B.C. Fam, S. Andrikopoulos, J. Proietto, C.Z. Görgün, D.C.C.S. Hotamisligil, M.A. Febbraio, T.W. Kay, and B.E. Kemp, "Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling," *Cell Metabolism*, vol. 4, Dec. 2006, pp. 465–474.
 - [111] N. Nath, M. Khan, R. Rattan, A. Mangalam, R.S. Makkar, C. de Meester, L. Bertrand, I. Singh, Y. Chen, B. Viollet, and S. Giri, "Loss of AMPK exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis disease severity," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 386, 2009, pp. 16–20.
 - [112] H.M. Marsden and F.H. Bronson, "Estrous synchrony in mice: alteration by exposure to male urine," *Science*, vol. 144, 1964, p. 1469.
 - [113] W.K. Whitten, "Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male," *The Journal of Endocrinology*, vol. 13, 1956, pp. 399–404.
 - [114] F.A. Gonnert, P. Recknagel, M. Seidel, N. Jbeily, K. Dahlke, C.L. Bockmeyer, J. Winning, W. Lösche, R.A. Claus, and M. Bauer, "Characteristics of Clinical Sepsis Reflected in a Reliable and Reproducible Rodent Sepsis Model," *Journal of Surgical Research*, vol. 170, 2011, pp. e123–e134.
 - [115] G.B. Johnson, G.J. Brunn, and J.L. Platt, "Cutting Edge: An Endogenous Pathway to Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Like Reactions through Toll-Like Receptor 4," *The Journal of Endocrinology*, vol. 172, 2004, pp. 20–24.
 - [116] J. Moitra, S. Sammani, and J.G. Garcia, "Re-evaluation of Evans Blue dye as a marker of albumin clearance in murine models of acute lung injury," *Translational Research: the journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 150, 2007, pp. 253–265.
 - [117] F.F. Mandy, M. Bergeron, and T. Minkus, "Principles of Flow Cytometry," *Transfusion Science*, vol. 16, 1995, pp. 303–314.
 - [118] R. Szulcek, H.J. Bogaard, and G.P. van Nieuw Amerongen, "Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 85, 2014, p. 51300.
 - [119] P. Recknagel, F.A. Gonnert, M. Westermann, S. Lambeck, A. Lupp, A. Rudiger, A. Dyson, J.E. Carré, A. Kortgen, C. Krafft, J. Popp, C. Sponholz, V. Fuhrmann, I. Hilger, R.A. Claus, N.C. Riedemann, R. Wetzker, M. Singer, M. Trauner, and M. Bauer, "Liver Dysfunction and Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalling in Early Sepsis: Experimental Studies in Rodent Models of Peritonitis," *PLoS One*, vol. 9, 2012, p. e1001338.
 - [120] Y. Dagon, E. Hur, B. Zheng, K. Wellenstein, L.C. Cantley, and B.B. Kahn, "p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake," *Cell Metabolism*, vol. 16, 2012, pp. 104–112.
 - [121] K. Funahashi, X. Cao, M. Yamauchi, Y. Kozaki, N. Ishiguro, and F. Kambe, "Prostaglandin E2 negatively regulates AMP-activated protein kinase via protein kinase A signaling pathway," *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, vol. 88, 2009, pp. 31–35.
 - [122] S. Horman, D. Vertommen, R. Heath, D. Neumann, V. Mouton, A. Woods, U. Schlattner, T. Wallimann, D. Carling, L. Hue, and M.H. Rider, "Insulin Antagonizes Ischemia-induced Thr172 Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase β -Subunits in Heart via Hierarchical Phosphorylation of Ser485/491," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, 2006, pp. 3553–5340.

- [123] R.L. Hurley, L.K. Barré, S.D. Wood, K.A. Anderson, B.E. Kemp, A.R. Means, and L.A. Witters, "Regulation of AMP-activated Protein Kinase by Multisite Phosphorylation in Response to Agents That Elevate Cellular cAMP," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, 2006, pp. 36662–36672.
- [124] J. Mankouri, P.R. Tedbury, S. Gretton, M.E. Hughes, S.D.C. Griffin, M.L. Dallas, K.A. Green, G. Hardie, C. Peers, and M. Harris, "Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, 2010, pp. 11549–11554.
- [125] T. Pulnikunnil, H. He, D. Kong, K. Asakura, O.D. Peroni, A. Lee, and B.B. Kahn, "Adrenergic Regulation of AMP-activated Protein Kinase in Brown Adipose Tissue in Vivo," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, 2011, pp. 8796–8809.
- [126] P. Recknagel, F.A. Gonnert, and E. Halibasic, M. Gajda, N. Jbeily, and A. Lupp andl. Rubio, R.A. Claus, A.K.M. Trauner, M. Singer, M. Trauner, and M. Bauer, "Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats," *Liver International*, vol. 33, 2013, pp. 283–293.
- [127] D. Rittirsch, L.M. Hoesel, and P.A. Ward, "The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, 2007, pp. 137–143.
- [128] M.K. Angele, S. Pratschke, W.J. Hubbard, and I.H. Chaudry, "Gender differences in sepsis: Cardiovascular and immunological aspects," *Virulence*, vol. 5, 2014, pp. 12–19.
- [129] M.D. Diodato, M.W. Knöferl, M.G. Schwacha, K.I. Bland, and I.H. Chaudry, "Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis," *Cytokine*, vol. 14, 2001, pp. 162–169.
- [130] R. Zellweger, M. Wichmann, A. Ayala, C.M. DeMaso, and I.H. Chaudry, "Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males," *Critical Care Medicine*, vol. 25, 1997, pp. 106–110.
- [131] S. Yang and J. Wang, "Estrogen Activates AMP-Activated Protein Kinase in Human Endothelial Cells via ERbeta/Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase beta Pathway," *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 72, 2015, pp. 701–707.
- [132] R.S. Hotchkiss and I.E. Karl, "The pathophysiology and treatment of sepsis," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, 2003, pp. 138–150.
- [133] M. Radu and J. Chernoff, "An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 73, 2013, p. e50062.
- [134] S.K. Ramaiah and H. Jaeschke, "Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Acute Inflammatory Liver Injury," *Toxicologic Pathology*, vol. 35, 2007, pp. 757–766.
- [135] H. Spapen, "Liver Perfusion in Sepsis, Septic Shock, and Multiorgan Failure," *The Anatomical Record*, vol. 291, 2008, pp. 714–720.
- [136] F. Braet and E. Wisse, "Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review," *Comparative Hepatology*, vol. 1, 2002, p. 1.
- [137] H. Yokomori, M. Oda, K. Yoshimura, T. Nagai, M. Ogi, M. Nomura, and H. Ishii, "Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells," *Liver International*, vol. 23, 2003, pp. 467–475.
- [138] B.R. Dobbs, G.W.T. Rogers, H.Y. Xing, and R. Fraser, "Endotoxin-induced defenestration of the hepatic sinusoidal endothelium: a factor in the pathogenesis of cirrhosis?," *Liver International*, vol. 14, 1994, pp. 230–233.
- [139] R.E. Perri and V. Shah, "Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells," *Signaling Pathways in Liver Diseases*, J.-F. Dufour, P.-A. Clavien, C. Trautwein, and R. Graf, eds., Springer Berlin Heidelberg, 2005, pp. 53–62.
- [140] V.C. Cogger, M. Muller, R. Fraser, A.J. McLean, J. Khan, and D.G.L. Couteur, "The effects of oxidative stress on the liver sieve," *Journal of Hepatology*, vol. 41, 2004, pp. 370–376.

- [141] R.D. Zanger, E. Wisse, F. Braet, D. Knook, S. Arai, T. Sasaoki, and K. Wake, *Direct and Kupffer cell mediated effects of LPS on isolated rat liver sinusoidal endothelial cells*, *Cells of the Hepatic Sinusoid*, Vol.5 pg 366-367, 1995.
- [142] C. Geraud, K. Evdokimov, B.K. Straub, W.K. Peitsch, A. Demory, Y. Dörflinger, K. Schledzewski, A. Schmieder, P. Schemmer, H.G. Augustin, P. Schirmacher, and S. Goerdts, "Unique Cell Type-Specific Junctional Complexes in Vascular Endothelium of Human and Rat Liver Sinusoids," *PLoS One*, vol. 7, 2012, p. e34206.
- [143] L.C. Chen, R.E. Gordon, J.D. Laskin, and D.L. Laskin, "Role of TLR-4 in Liver Macrophage and Endothelial Cell Responsiveness During Acute Endotoxemia," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 83, 2007, pp. 311–326.
- [144] B. McDonald, C.N. Jenne, Z. Lisheng, K. Kimata, and P. Kubes, "Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 305, 2013, pp. 797–806.
- [145] Y. Ito, E.R. Abril, N.W. Beetha, M.K. McCuskey, C. Cover, H. Jaeschke, and R.S. McCuskey, "Mechanisms and pathophysiological implications of sinusoidal endothelial cell gap formation following treatment with galactosamine/endotoxin in mice," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 291, 2006, pp. G211–G218.
- [146] L.A. Madge and J.S. Pober, "TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 70, 2001, pp. 317–325.
- [147] J.G. Chosay, N.A. Essani, C.J. Dunn, and H. Jaeschke, "Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury," *The American Journal of Physiology*, vol. 272, 1997, pp. 1195–1200.
- [148] D.H. Adams, C. Ju, S.K. Ramaiah, J. Uetrecht, and H. Jaeschke, "Mechanisms of Immune-Mediated Liver Injury," *Toxicological Sciences*, vol. 115, 2010, pp. 307–321.
- [149] M. van Oosten, E. van de Bilt, H.E. de Vries, and T.J. van Berkei, "Vascular Adhesion Molecule - I and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression on Rat Liver Cells After Lipopolysaccharide Administration In Vivo," *Hepatology*, vol. 22, 1995, pp. 1538–1546.
- [150] H. Jaeschke, "Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 290, 2006, pp. G1083–G1088.
- [151] H. Jaeschke, C.W. Smith, M.G. Clemens, P.E. Ganey, and R.A. Roth, "Mechanisms of Inflammatory Liver Injury: Adhesion Molecules and Cytotoxicity of Neutrophils," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 139, 1996, pp. 213–226.
- [152] H. Jaeschke, "Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 26, 2011, pp. 173–179.
- [153] C. Sponholz, F.A. Gonnert, A. Kortgen, and M. Bauer, "Monitoring of liver function in the critically ill," *Der Anaesthetist*, vol. 63, 2014, pp. 603–614.
- [154] P. He, "Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled?," *Cardiovascular Research*, vol. 87, 2010, pp. 281–290.
- [155] M.S. Blum, E. Toninelli, J.M. Anderson, M.S. Balda, J. Zhou, L. O'Donnelli, R. Pardi, and J.R. Bender, "Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines," *The American Journal of Physiology*, vol. 273, 1997, pp. 286–294.
- [156] N.V. Bogatcheva and A.D. Verin, "Reprint of "The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function," *Microvascular Research*, vol. 77, 2009, pp. 64–69.
- [157] J. Oldenburg and J. de Rooij, "Mechanical control of the endothelial barrier," *Cell and Tissue Research*, vol. 355, 2014, pp. 545–555.

- [158] Q. Shen, R.R. Rigor, C.D. Pivetti, M.H. Wu, and S.Y. Yuan, "Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function," *Cardiovascular Research*, vol. 87, 2010, pp. 272–280.
- [159] Q. Shen, M.H. Wu, and S.Y. Yuan, "Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability," *Journal of Cell Health and Cytoskeleton*, vol. 1, 2009, pp. 43–50.
- [160] S.M. Stamatovic, R.F. Keep, S.L. Kunkel, and A.V. Andjelkovic, "Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase," *Journal of Cell Science*, vol. 116, 2003, pp. 4615–4628.
- [161] O. Tornavaca, M. Chia, N. Dufton, L.O. Almagro, D.E. Conway, A.M. Randi, M.A. Schwartz, K. Matter, and M.S. Balda, "ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation," *The Journal of Cell Biology*, vol. 208, Mar. 2015, pp. 821–838.
- [162] R.S.J. Beard, R.J. Haines, K.Y. Wu, J.J. Reynolds, S.M. Davis, J.E. Elliott, N.L. Malinin, V. Chatterjee, B.J. Cha, M.H. Wu, and S.Y. Yuan, "Non-muscle Mlck is required for beta-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1beta-mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells," *Journal of Cell Science*, vol. 127, Apr. 2014, pp. 1840–1853.
- [163] T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita, "Size-selective loosening of the blood-brain-barrier in claudin-5-deficient mice," *The Journal of Cell Biology*, vol. 161, 2003, pp. 653–660.
- [164] L. Zhang, F. Jouret, J. Rinehart, J. Sfakianos, I. Mellman, R.P. Lifton, L.H. Young, and M.J. Caplan, "AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) inhibition induce Ca²⁺-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, 2011, pp. 16879–16890.
- [165] L. Zhang, J. Li, L.H. Young, and M.J. Caplan, "AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, 2006, pp. 17272–17277.
- [166] J. Creighton, M.Y. Jian, S. Sayner, M. Alexejev, and P.A. Insel, "Adenosine monophosphate-activated kinase alpha1 promotes endothelial barrier repair," *The FASEB Journal*, vol. 25, 2011, pp. 3356–3365.
- [167] C. Blume, P.M. Benz, U. Walter, J. Ha, B.E. Kemp, and T. Renné, "AMP-activated Protein Kinase Impairs Endothelial Actin Cytoskeleton Assembly by Phosphorylating Vasodilator-stimulated Phosphoprotein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, 2007, pp. 4601–4612.
- [168] M.A. Schmit, V. Mirakaj, M. Stangassinger, K. König, D. Köhler, and P. Rosenberger, "Vasodilator phosphostimulated protein (VASP) protects endothelial barrier function during hypoxia," *Inflammation*, vol. 35, 2012, pp. 566–573.
- [169] P.-S. Chiu and S.-C. Lai, "Matrix Metalloproteinase-9 Leads to Claudin-5 Degradation via the NF- κ B Pathway in BALB/c Mice with Eosinophilic Meningoencephalitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*," *PLoS One*, vol. 8, 2013.
- [170] I. Mandel, T. Paperna, A. Volkowich, M. Merhav, L. Glass-Marmor, and A. Miller, "The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation," *Journal of Cell Biology*, vol. 113, 2012, pp. 2415–2423.
- [171] J. Xing, Q. Wang, K. Coughlan, B. Viollet, C. Moriasi, and M.-H. Zou, "Inhibition of AMP-activated Protein Kinase Accentuates Lipopolysaccharide-Induced Lung Endothelial Barrier Dysfunction and Lung Injury in vitro," *The American Journal of Pathology*, vol. 182, 2013, pp. 1021–1030.
- [172] N. Zippel, R.A. Malik, T. Frömel, R. Popp, E. Bess, B. Strilic, N. Wettschureck, I. Fleming, and B. Fisslthaler, "Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 regulates angiogenesis via AMP-activated protein kinase-alpha1 and redox balance in endothelial cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 33, 2013, pp. 2792–2799.

- [173] D.A. Escobar, A.M. Botero-Quintero, B.C. Kautza, J. Luciano, P. Loughran, S. Darwiche, M.R. Rosengart, B.S. Zuckerbraun, and H. Gomez, "Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation protects against sepsis-induced organ injury and inflammation," *Journal of Surgical Research*, vol. 194, 2015, pp. 262–272.
- [174] J.-K. Min, Y.-M. Kim, S.W. Kim, M.-C. Kwon, Y.-Y. Kong, I.K. Hwang, M.H. Won, J. Rho, and Y.-G. Kwon, "TNF-Related Activation-Induced Cytokine Enhances Leukocyte Adhesiveness: Induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF Receptor-Associated Factor and Protein Kinase C-Dependent NF-kappaB Activation in Endothelial Cells," *Journal of Immunology*, vol. 175, 2005, pp. 531–540.
- [175] M.D. Fullerton, G.R. Steinberg, and J.D. Schertzer, "Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 366, 2012, pp. 224–234.
- [176] Z. Yang, B.B. Kahn, H. Shi, and B.-Z. Xue, "Macrophage alpha1 AMP-activated Protein Kinase (alpha1AMPK) Antagonizes Fatty Acid-induced Inflammation through SIRT1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, 2010, pp. 19051–19059.
- [177] P. Viatour, M.P. Merville, V. Bours, and A. Chariot, "Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 30, 2005, pp. 43–52.
- [178] S. Ghosh and M. Karin, "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle," *Cell*, vol. 109, 2002, pp. 81–96.
- [179] F. Yeung, J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, and M.W. Mayo, "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase," *The EMBO Journal*, vol. 23, 2004, pp. 2369–2380.
- [180] M.S. Hayden and S. Ghosh, "Signaling to NF-kB," *Genes & Development*, vol. 18, 2004, pp. 2195–2224.
- [181] H. Zhong, M.J. May, E. Jimi, and S. Ghosh, "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1," *Molecular Cell*, vol. 9, 2002, pp. 625–636.
- [182] H. Zhong, R.E. Voll, and S. Ghosh, "Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300," *Molecular Cell*, vol. 1, 1998, pp. 661–671.
- [183] L.F. Chen, Y. Mu, and W.C. Greene, "Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB," *The EMBO Journal*, vol. 21, 2002, pp. 6539–6548.
- [184] M.Y. Jian, M.F. Alexeyev, P.E. Wolkowicz, J.W. Zmijewski, and J.R. Creighton, "Metformin stimulated AMPKalpha1 promotes microvascular repair in acute lung injury," *American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 305, 2013, pp. 844–855.
- [185] G. Alba, R.E. Bekay, M. Alvarez-Maqueda, P. Chacón, A. Vega, J. Monteseirín, C.S. María, E. Pintado, F.J. Bedoya, R. Bartrons, and F. Sobrino, "Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils," *FEBS Letters*, vol. 573, 2004, pp. 219–225.
- [186] J.S. Gujral, J.A. Hinson, A. Farhood, and H. Jaeschke, "NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, 2004, pp. 243–252.
- [187] D. Fu, Y. Wakabayashi, J. Lippincott-Schwartz, and I.M. Arias, "Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, 2011, pp. 1403–1408.

-
- [188] Z. Zhao, J. Hu, X. Gao, H. Liang, and Z. Liu, "Activation of AMPK attenuates lipopolysaccharide-impaired integrity and function of blood–brain barrier in human brain microvascular endothelial cells," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 97, 2014, pp. 386–392.
- [189] J. Gavard and J.S. Gutkind, "VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango," *Nature Cell Biology*, vol. 10, 2008, pp. 883–885.
- [190] A. Taddei, C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviario, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler, and E. Dejana, "Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5," *Nature Cell Biology*, vol. 10, Aug. 2008, pp. 923–934.
- [191] M. Aslam, N. Ahmad, R. Srivastava, and B. Hemmer, "TNF-alpha induced NFkappaB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells," *Cytokine*, vol. 57, 2012, pp. 269–275.
- [192] M. Burek and C.Y. Förster, "Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 298, 2009, pp. 19–24.
- [193] M. Burek, K. Steinberg, and C.Y. Förster, "Mechanisms of transcriptional activation of the mouse claudin-5 promoter by estrogen receptor alpha and beta," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 392, 2014, pp. 144–151.
- [194] F.M. Awan, S. Anjum, A. Obaid, A. Ali, R.Z. Paracha, and H.A. Janjua, "In-silico analysis of claudin-5 reveals novel putative sites for post-translational modifications: Insights into potential molecular determinants of blood–brain barrier breach during HIV-1 infiltration," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 27, 2014, pp. 355–365.
- [195] S. Ducommun, M. Deak, D. Sumpton, R.J. Ford, A.N. Galindo, M. Kussmann, B. Viollet, G.R. Steinberg, M. Foret, L. Davon, N.A. Morrice, and K. Sakamoto, "Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate," *Cellular Signalling*, vol. 27, 2015, pp. 978–988.
- [196] A.J. Hoogendijk, S.S. Pinhancos, T. van der Poll, and C.W. Wieland, "AMP-activated Protein Kinase Activation by 5-Aminoimidazole-4-carbox-amide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) Reduces Lipoteichoic Acid-induced Lung Inflammation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, 2013, pp. 7047–7052.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ACC | Acetyl-CoenzymA-Carboxylase |
| AICAR | 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid |
| Akt | Proteinkinase B (PKB) |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AMP | Adenosin-Monophosphat |
| AMPK | 5'AMP-aktivierte Proteinkinase |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CaMKK β | Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase β |
| CBA | <i>Cytometric Bead Assay</i> |
| CBP | <i>CREB-binding protein</i> |
| CD31 | <i>cluster of differentiation 31</i> |
| cpm | <i>counts per minute</i> |
| CREB | <i>cAMP-response element-binding</i> |
| DAMP | <i>danger-associated molecular pattern</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DOPE | Dioleylphosphatidylethanolamin |
| EB | <i>Evans Blue</i> |
| ECIS | <i>Electric Cell Impedance Sensing</i> |
| ECL | <i>Enhanced Chemoluminescence</i> |
| eNOS | Endotheliale NO-Synthase |
| ERK | <i>extracellular signal regulated-kinase</i> |
| FITC | <i>Fluoresceinisoithiocyanate</i> |
| FoxO1 | <i>Forhead box protein O1</i> |
| HBSS | <i>Hanks Balanced Salt Solution</i> |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HMGR | 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoenzymA-Reduktase |
| HRP | <i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| HUVEC | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> |
| ICAM-1 | <i>intercellular adhesion molecule-1</i> |

| | |
|------------|---|
| IF | Immunfluoreszenz |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| IκB | Inhibitor von κB |
| IKK | IκB-Kinase |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IP | Immunpräzipitation |
| K | Lysin |
| KG | Körpergewicht |
| KO | <i>knockout</i> |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| LKB1 | Leber Kinase B1 |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LSC | <i>Liquid Scintillation Counter</i> |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| MCP-1 | <i>monocyte chemotactic protein-1</i> |
| MMP | Matrixmetalloproteasen |
| 0,9 % NaCl | Physiologische Kochsalzlösung |
| NF-κB | <i>nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| nmMLC | <i>non-muscular myosin light chain</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| p | phospho |
| PAMPs | <i>pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PAS | Protein-A-Sepharose |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM-1 | <i>Platelet-endothelial cell-adhesion molecule-1</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMN | <i>polymorphonuclear leukocytes</i> (polymorphkernige neutrophile Granulozyten) |
| PP2Cα | Protein Phosphatase 2 Cα |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies) |

| | |
|---------------|---|
| S | Serin |
| SAINT-18 | N-methyl-4-(dioleyl)methylpyridinimchlorid |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SIRS | <i>systemic inflammatory response syndrome</i> |
| T | Threonin |
| TAK1 | <i>tumor growth factor-β-aktivierte Kinase 1</i> |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TF | <i>tissue factor</i> |
| TG | Trockengewicht |
| TGF- β | <i>tumor growth factor-β</i> |
| TLR4 | <i>Toll like receptor 4</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| VAP-1 | <i>vascular adhesion protein 1</i> |
| VASP | <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> |
| VCAM-1 | <i>vascular cell adhesion molecule</i> |
| VE-Cadherin | <i>vascular-endothelial cadherin</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| WT | Wildtyp |
| Y | Tyrosin |
| ZO-1 | Zona occludens-1 |

6.2 Supplement

6.2.1 Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in HUVEC durch IL-1 β , TNF- α und LPS – zusätzliche Daten zu 3.2.1

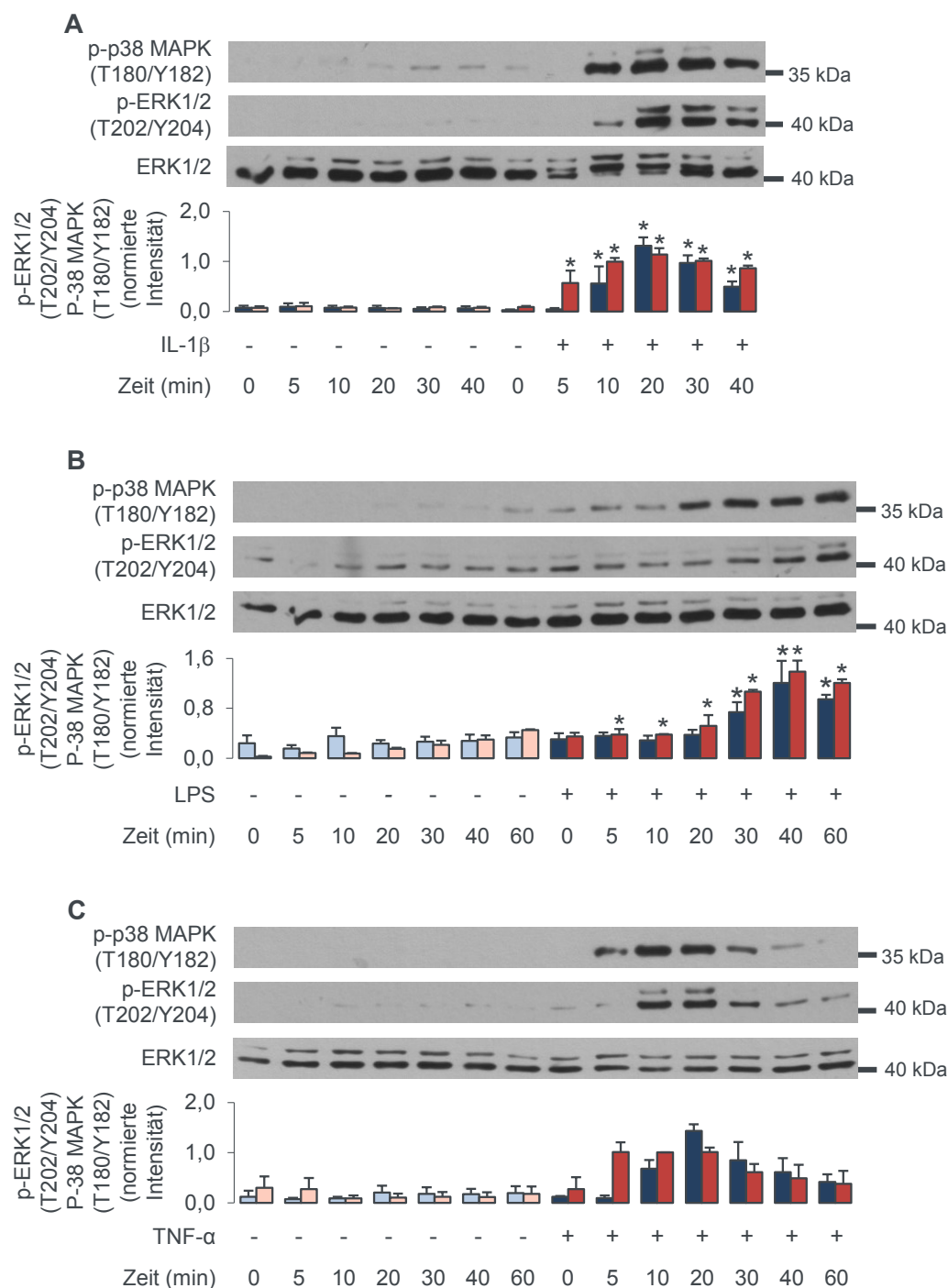


Abbildung S. 43: MAPK werden in HUVEC durch Zytokine und LPS aktiviert. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α oder 1 μ g/ml LPS stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung der MAPK nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der p38 MAPK (rot)- und ERK1/2-Phosphorylierung (blau) von 3 Blots (IL-1 β - beziehungsweise LPS-Stimulierung) oder 2 Blots (TNF- α -Stimulierung) (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle), $n = 2-3$.

Die Stimulierung von HUVEC mit den IL-1 β oder TNF- α (Abbildung S. 43A und B) zeigte eine transiente Phosphorylierung von p38 MAPK und ERK1/2 zwischen 10 und 40 Minuten und einer Rückkehr zum Ausgangsniveau nach 60 Minuten. Die Stimulierung mit LPS zeigte eine zeitlich leicht verzögerte Phosphorylierung der MAPK (Abbildung S. 43C).

6.2.2 Expression von Adhäsionsmolekülen in HUVEC durch IL-1 β , TNF- α und LPS – zusätzliche Daten zu 3.2.2

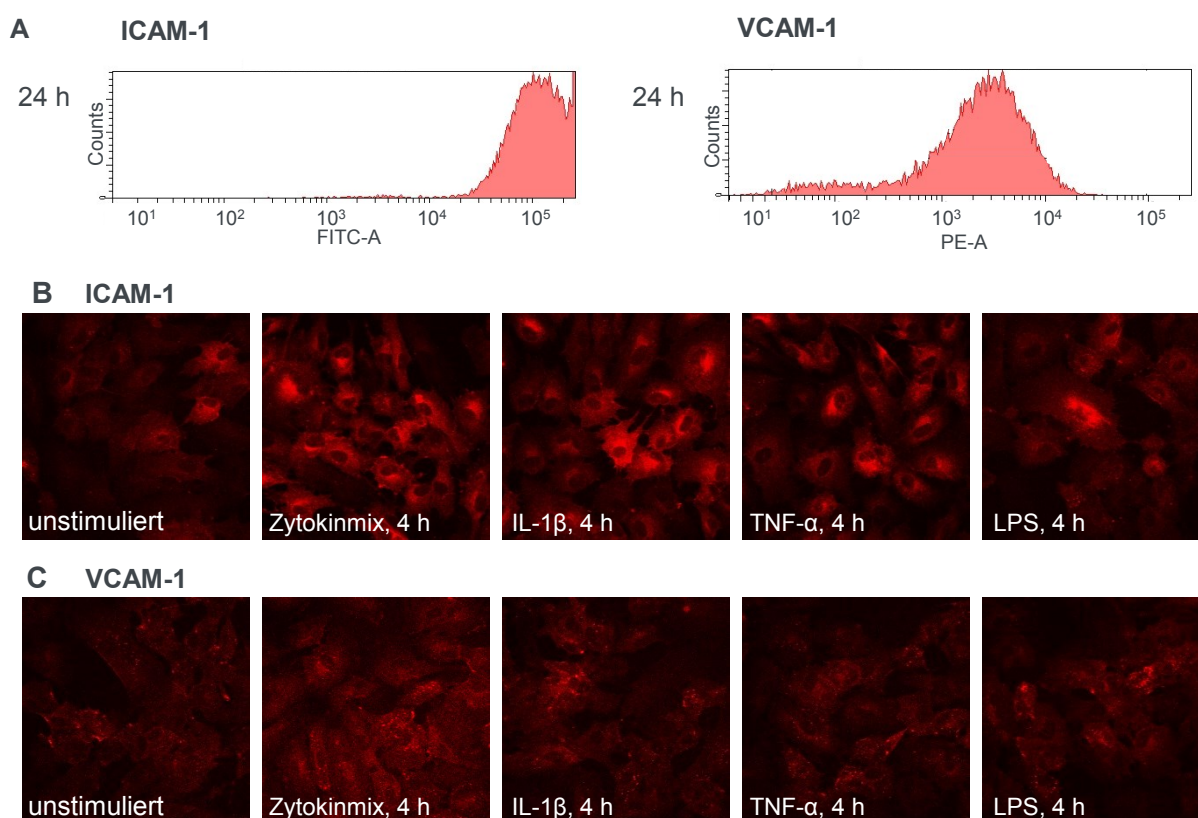


Abbildung S. 44: Stimulierung von HUVEC mit Zytokinmix sowie einzelnen Zytokinen und LPS induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen. HUVEC wurden für entsprechende Zeiten mit 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α oder 1 μ g/ml LPS oder einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS behandelt. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen anschließend fixiert, permeabilisiert, mit einem Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen fixiert, trypsiniert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gegen ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt Histogramme und Beispielbilder (200-fache Vergrößerung) der zeitabhängigen ICAM-1 und VCAM-1-Expression eines Experiments. **A** zeigt die Durchflusszytometrie-Ergebnisse 24 Stunden nach Zytokinmix-Stimulierung. **B** zeigt die Färbung von ICAM-1, **C** zeigt die Färbung von VCAM-1 nach Stimulierung mit Zytokinmix und einzelnen Zytokinen sowie LPS n=1.

24 Stunden nach Zytokinmix-Zusatz war in Durchflusszytometrie-Analysen eine Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in HUVEC nachweisbar (Abbildung S. 44A). Hier ist dargestellt, dass die individuelle Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α sowie in geringerem Maße auch mit LPS 4 Stunden zu einer Expression von ICAM-1 und VCAM-1 führten (Abbildung S. 44B und C).

6.2.3 AMPK-Aktivierbarkeit nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli (Langzeit-Experimente) – zusätzliche Daten zu 3.3.2

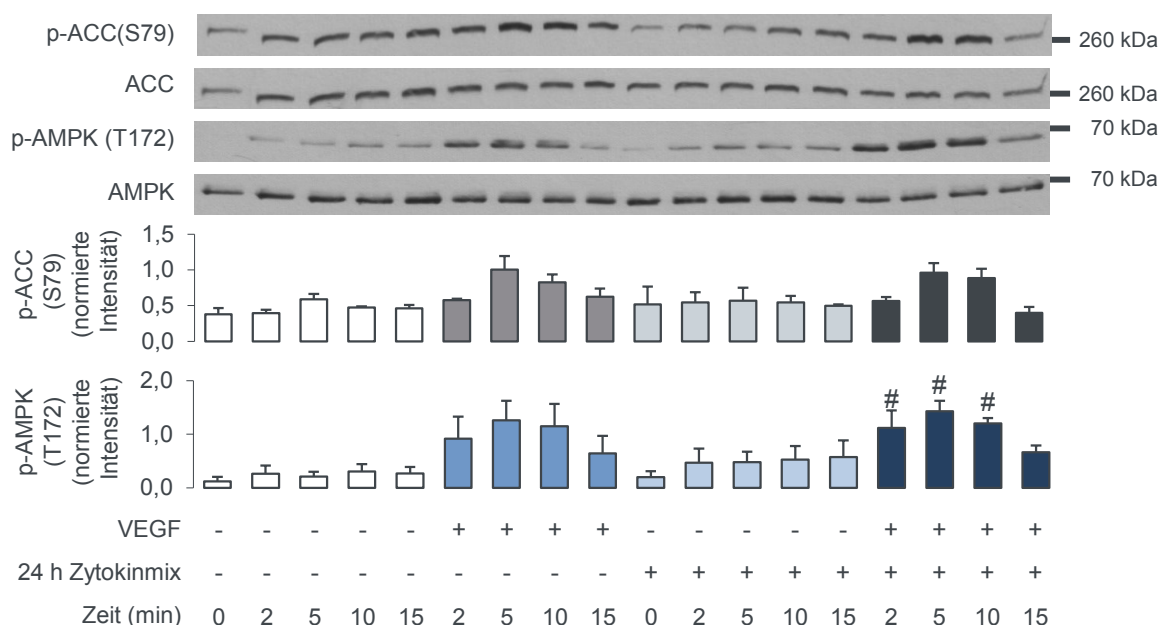


Abbildung S. 45: Die Stimulierung mit Zytokinmix hat keinen Einfluss auf eine nachfolgende AMPK-Aktivierung. HUVEC wurden für 24 Stunden mit einem Mix aus 50 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α und 1 μ g/ml LPS behandelt. Danach wurden die Zellen zeitabhängig mit 50 ng/ml VEGF stimuliert und anschließend lysiert. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von ACC und AMPK sowie das ACC- und AMPK-Gesamtprotein nachgewiesen. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots sowie die densitometrische Auswertung der S79-Phosphorylierung der ACC (grau) und der T172-Phosphorylierung der AMPK (blau). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ im Vergleich zur Zytokinmix-vorbehandelten Kontrolle, $n = 3$.

Abbildung S. 45 zeigt, dass eine 24-stündige Behandlung von HUVEC mit Zytokinmix zu einer leicht erhöhten T172-Phosphorylierung der AMPK führte, die sich jedoch nicht in einer S79-Phosphorylierung der ACC widerspiegelte. Eine AMPK-Aktivierung durch VEGF wurde durch Zytokinmix-Vorbehandlung nicht verhindert, was auch anhand der S79-Phosphorylierung der ACC zu erkennen war.

6.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Komponenten des Gefäßsystems. | 1 |
| Abbildung 2: Phänotypische Unterschiede zwischen Endothelzellen unterschiedlicher vaskulärer Gebiete. | 2 |
| Abbildung 3: Veränderung des endothelialen Phänotyps nach Kontakt mit proinflammatorischen Mediatoren. | 3 |
| Abbildung 4: Transportwege für Moleküle durch die Endothelzell-Monolayer. | 5 |
| Abbildung 5: Ablauf einer Entzündungsreaktion. | 6 |
| Abbildung 6: Abgrenzung und Schnittstellen von Sepsis, Infektion und systemic inflammatory response syndrome (SIRS). | 8 |
| Abbildung 7: Aktivierung der AMPK durch AMP und Phosphorylierung. | 10 |
| Abbildung 8: Aktivierung und Effekte der AMPK. | 11 |
| Abbildung 9: Die Schutzfunktion der AMPK in Endothelzellen. | 13 |
| Abbildung 10: Schneiden der Leber für Paraffineinbettung. | 36 |
| Abbildung 11: Prinzip der Zytokinmessung mittels BD™ Cytometric Bead Array CBA. | 39 |
| Abbildung 12: Transfektionsprotokoll für SAINT-RED. | 42 |
| Abbildung 13: Prinzip des Proteinnachweis mit Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Technik. | 46 |
| Abbildung 14: Prinzip der Durchflusszytometrie. | 49 |
| Abbildung 15: Prinzip der Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Messung. | 51 |
| Abbildung 16: AMPK α 1-KO-Weibchen zeigen eine erhöhte systemische Inflamationsantwort. | 53 |
| Abbildung 17: Dosistest zur Überlebensstudie. | 54 |
| Abbildung 18: AMPK α 1-KO-Weibchen zeigen nach LPS-Injektion eine signifikant erhöhte Mortalität. | 55 |
| Abbildung 19: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine verstärkte Permeabilitätserhöhung in der Leber. | 56 |
| Abbildung 20: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion leicht erhöhte Zytokinspiegel in der Leber. | 57 |
| Abbildung 21: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine gering verstärkte Einwanderung von Leukozyten in die Leber. | 58 |
| Abbildung 22: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen keine Unterschiede in der Gesamtleberstruktur 6 Stunden nach LPS-Injektion. | 59 |
| Abbildung 23: AMPK α 1-KO-Mäuse weisen eine erhöhte LPS-induzierte Leberschädigung auf. | 61 |
| Abbildung 24: LPS führt zur Schädigung des sinusoidalen Endothels. | 62 |
| Abbildung 25: AMPK α 1-KO-Mäuse zeigen 6 Stunden nach LPS-Injektion eine stärkere Verminderung der Claudin-5-Expression in der Leber. | 63 |
| Abbildung 26: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix aktiviert MAPK. | 64 |
| Abbildung 27: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix aktiviert NF- κ B. | 64 |
| Abbildung 28: Stimulierung von HUVEC mit einem Zytokinmix induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen. | 65 |
| Abbildung 29: Zytokin- und Endotoxin-Behandlung führen zu einer Veränderung der Barrierefunktion von HUVEC. | 66 |
| Abbildung 30: Stimulierung mit Zytokinmix bewirkt eine S485-Phosphorylierung der AMPK. | 67 |
| Abbildung 31: IL-1 β und TNF- α bewirken eine S485-Phosphorylierung der AMPK. | 69 |
| Abbildung 32: IL-1 β -Stimulierung bewirkt keine Veränderung der AMPK-Aktivität. | 69 |
| Abbildung 33: Die Stimulierung mit Zytokinmix hat keinen Einfluss auf eine nachfolgende AMPK-Aktivierung. | 70 |
| Abbildung 34: Eine Aktivierung der AMPK bewirkt eine verminderte Zytokin-induzierte ICAM-1- und VCAM-1-Expression. | 72 |
| Abbildung 35: AMPK α 1-siRNA führt in HUVEC zu einer Herunterregulierung von AMPK α 1. | 73 |
| Abbildung 36: Eine Herunterregulierung der katalytischen AMPK α 1-Untereinheit bewirkt keine Veränderung der Zytokinmix-induzierten Adhäsionsmolekül-Expression. | 73 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 37: Die Aktivierung der AMPK verzögert die Zytokin-vermittelte Barrierestörung | 75 |
| Abbildung 38: Herunterregulierung von AMPK α 1 führt zu einer verstärkten Zytokinmix- vermittelten Verringerung von Claudin-5 nach 6 Stunden. | 76 |
| Abbildung 39: AICAR-Behandlung von WT-Mäusen führt zu einer Verminderung der LPS- induzierten Permeabilitätserhöhung in der Leber.. | 77 |
| Abbildung 40: Eine aktivierte AMPK kann die Expression von Adhäsionsmolekülen hemmen – möglicher Mechanismus über eine Hemmung von NF- κ B..... | 90 |
| Abbildung 41: Expression Expression von Claudin-5 und sein Abbau unter Entzündungsbedingungen. | 94 |
| Abbildung 42: Möglicher Mechanismus der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten durch eine aktivierte AMPK im Leberendothel. | 96 |
| Abbildung S. 43: MAPK werden in HUVEC durch Zytokine und LPS aktiviert..... | 113 |
| Abbildung S. 44: Stimulierung von HUVEC mit Zytokinmix sowie einzelnen Zytokinen und LPS induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen. | 114 |
| Abbildung S. 45: Die Stimulierung mit Zytokinmix hat keinen Einfluss auf eine nachfolgende AMPK-Aktivierung..... | 115 |

6.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien | 16 |
| Tabelle 2: Inhibitoren und Stimulanzen | 18 |
| Tabelle 3: Primärantikörper für Western Blot | 19 |
| Tabelle 4: Sekundärantikörper für Western Blot | 19 |
| Tabelle 5: Antikörper für Immunpräzipitation (IP) | 19 |
| Tabelle 6: Primärantikörper für Immunfluoreszenz (IF) | 20 |
| Tabelle 7: Sekundärantikörper für IF | 20 |
| Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie | 20 |
| Tabelle 9: Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC) | 20 |
| Tabelle 10: Sekundärantikörper für IHC | 20 |
| Tabelle 11: Antikörper für die Zytokinmessung | 21 |
| Tabelle 12: siRNA | 21 |
| Tabelle 13: Primer für Genotypisierung | 22 |
| Tabelle 14: Zellkultur- und Transfektionsreagenzien | 22 |
| Tabelle 15: Zusammensetzung von Zellkulturmedien und -zusätzen | 22 |
| Tabelle 16: Puffer und Stammlösungen | 23 |
| Tabelle 17: Materialien | 28 |
| Tabelle 18: Slides für Leberparametermessung | 29 |
| Tabelle 19: Geräte | 29 |
| Tabelle 20: Ansätze für Genotypisierungs-PCR | 32 |
| Tabelle 21: PCR-Programm für Genotypisierung | 32 |
| Tabelle 22: Zellzahlen für die Aussaat auf verschiedene Zellkulturgefäße | 41 |
| Tabelle 23: Konzentration der bei den Versuchen eingesetzten Substanzen | 43 |
| Tabelle 24: Pipettierschema für Polyacrylamidgele | 44 |

6.5 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Regine Heller für die Bereitstellung des Themas und die exzellente wissenschaftliche und auch persönliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich dem CSCC, dem CSCC-RTG und allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie. Dabei gilt mein besonderer Dank der gesamten Arbeitsgruppe Heller, die das Erstellen dieser Arbeit in einem sehr angenehmen Arbeitsumfeld ermöglichten. Spezieller Dank gilt dabei Katrin Spengler und Anne Knierim, die mir nicht nur im Labor, sondern auch persönlich stets zur Seite standen. Außerdem danke ich Elke Teuscher für die Bereitstellung von Zellen und ihre tatkräftige praktische und persönliche Unterstützung und Rose-Marie Zimmer für ihre Hilfe im Mauslabor.

Zudem gilt mein Dank Maria Bierbrauer und den Mitarbeitern der Service Einheit Kleintiere im Forschungszentrum in Lobeda für die Durchführung der Mauszucht.

Für Kooperationen, experimentelle Unterstützung und Ratschläge und Diskussionen bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Reinhard Bauer, Prof. Dr. Sandrine Horman, Prof. Dr. Otmar Huber, Dr. Diego Castanares-Zapatero, Dr. Darya Zibrova, Dr. Laura Bloch, Andreas Thuy und Jaqueline Fischer.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Peter Große und bei meiner gesamten Familie sowie bei meinen Freunden bedanken, die mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung der Arbeit unermüdlich unterstützt haben.

6.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Die Regulation der endothelialen Barriere durch 5' AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bei systemischer Entzündung“ selbst angefertigt habe. Ich habe dabei keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen. Des Weiteren habe ich alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mich Prof. Dr. Regine Heller (Betreuerin) und Prof. Dr. Reinhard Bauer unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen und kein Dritter hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, welche im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen. Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner weiteren Hochschule eine gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung als Dissertation eingereicht habe.

Jena,

6.7 Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Daten dieser Arbeit

Publikationen in Tagungsbänden

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Viollet B., Heller R.: The role of 5'-AMP-activated kinase (AMPK) in the regulation of endothelial cell dysfunction induced by inflammatory stress. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2014, *Perfusion* 2014 (1).

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Bloch L., Thuy A., Gräler M., Huber O., Bauer R., Viollet B., Heller R.: AMPK controls systemic inflammatory response: effects on endothelial permeability and liver function. 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2015, *Perfusion* 2015 (1).

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Bloch L., Thuy A., Castanares-Zapatero D., Gräler M., Huber O., Horman S., Viollet B., Heller R.: AMPK controls systemic inflammatory response: effects on endothelial permeability. 7. Internationaler Kongress "Sepsis and Multiorgan Dysfunction", 2015, *Infection* 2015 (43, Supplement 1).

Vorstellung der Daten bei Konferenzen

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Viollet B., Heller R.: The role of 5'-AMP-activated kinase (AMPK) in the regulation of endothelial cell dysfunction induced by inflammatory stress. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2014, Rauschholzhausen [Poster, Auszeichnung mit dem Eberhard-Betz-Preis]

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Bloch L., Thuy A., Gräler M., Huber O., Bauer R., Viollet B., Heller R.: AMPK controls systemic inflammatory response: effects on endothelial permeability and liver function. 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2015, Rauschholzhausen [Vortrag]

Lindenmüller S., Spengler K., von Loeffelholz C., Bloch L., Thuy A., Castanares-Zapatero D., Gräler M., Huber O., Horman S., Viollet B., Heller R.: AMPK controls systemic inflammatory response: effects on endothelial permeability. 7. Internationaler Kongress "Sepsis and Multiorgan Dysfunction", 2015, Weimar [Poster]